

Implementação de métodos para análise de matrizes alimentares por GC-FID

João Marcelo Félix Trigo

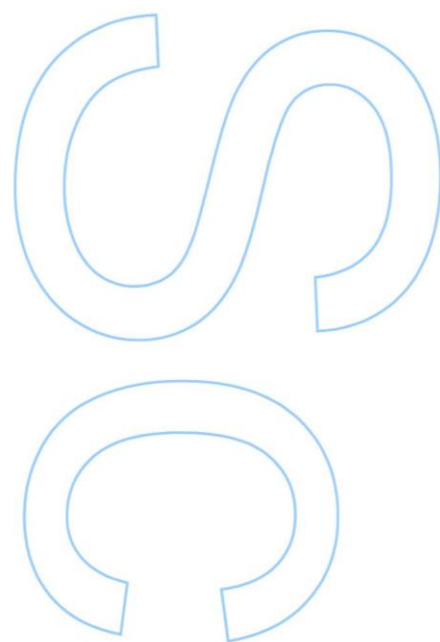
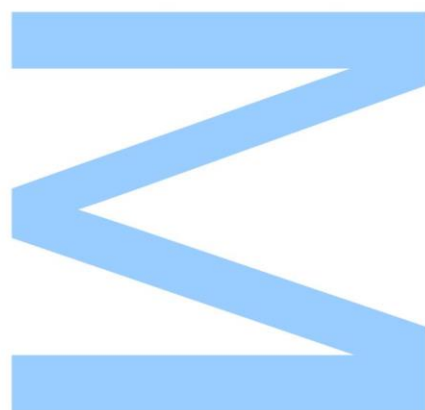
Mestrado em Química
Departamento de Química
2016

Orientador

Carlos Rocha Gomes
Professor Auxiliar
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Alice Santos
Responsável do Departamento de Química, Silliker Portugal



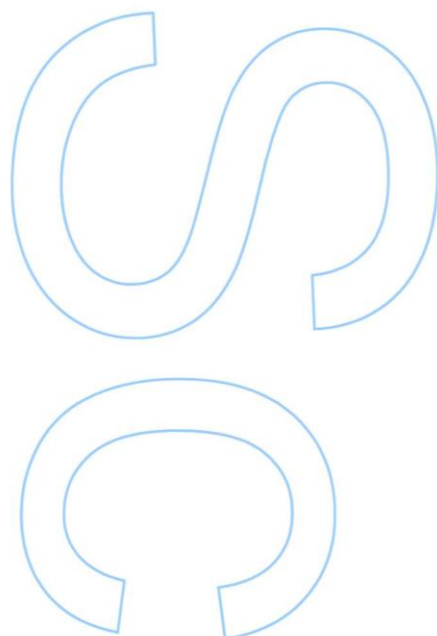
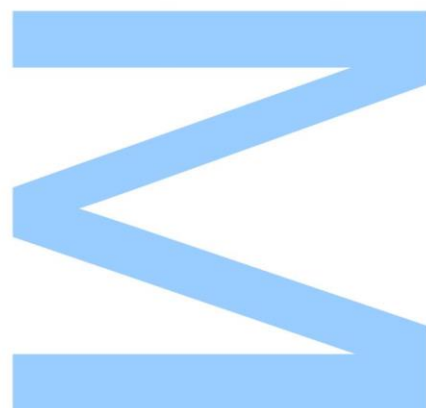


Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto,

_____/_____/_____



Agradecimentos

Antes de tudo, dedico esta tese à minha família, a quem devo um enorme obrigado por fazerem de mim a pessoa que sou hoje, pela educação que me deram, por toda a ajuda, por todo o apoio e por fazerem questão que eu saiba que independentemente de todas as decisões que tome e de tudo o que possa acontecer, posso sempre contar com eles.

A tese de mestrado apresentada representa o culminar de cinco anos de esforço e dedicação, acompanhados de bons momentos e maus momentos, todos eles importantes, que me fizeram crescer, tanto a nível pessoal como profissional.

Contudo, não percorri este percurso sozinho e resta-me apenas agradecer a todas as pessoas que o percorreram comigo.

Salientando-se entre todas essas pessoas, queria agradecer à Sara Ribeiro, pela sua amizade, por ter sido o meu braço direito ao longo de todo o meu percurso académico na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e por ter estado presente sempre que precisei.

Queria agradecer também ao Ricardo Reis, pela enorme ajuda no que toca à integração na empresa, por sempre se ter mostrado disponível para ajudar e pela motivação e apoio que sempre me foi dando ao longo de todo este estágio.

Devo também um grande obrigado ao Guilherme Ventura e ao João Magalhães por serem uns fantásticos parceiros de escrita.

Agradeço ao Rui César, ao José Carlos Ferreira, ao Manuel Loureiro e à Carmen Pinto por todos os conselhos dados e pelos bons momentos de descontração.

Para terminar o agradecimento geral a todas as pessoas que contribuíram para que todo este percurso fosse tão especial, divertido e enriquecedor, queria agradecer à Cláudia Tomé por toda a motivação que me deu, por se ter revelado uma ótima parceira de negócios e porque “o que o “Mastru” une, ninguém separa”.

Agradeço agora ao Professor Doutor Carlos Rocha Gomes, professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e à Dra. Alice Santos por toda a orientação prestada.

Resumo

O conhecimento da composição nutricional de produtos alimentares por parte do consumidor é, hoje em dia, imprescindível para o consumidor e obrigatório por lei, estando ao abrigo do Regulamento (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro.

Desta forma, é necessária a existência de instituições devidamente acreditadas, capazes de determinar quantitativamente e qualitativamente os diferentes compostos presentes nos mais diversos alimentos, responsabilizando-se, assim, pelo processo de rotulagem dos produtos alimentares que chegarão ao consumidor final.

O presente trabalho insere-se no âmbito da realização de um estágio curricular do plano de estudos do Mestrado em Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, a decorrer na empresa Silliker Portugal, S.A.

A Silliker Portugal, S.A., pertencente ao grupo multinacional Merieux NutriSciences, líder mundial na prestação de serviços para a melhoria da qualidade e segurança alimentar, oferece uma vasta área de serviços, tais como análise sensorial, consultadoria em segurança alimentar, auditorias, rotulagem e legislação, análises microbiológicas e químicas de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025.

Os objetivos delineados para este estágio passam por dois pontos essenciais:

- Validação de uma metodologia para a determinação de colesterol presente em alimentos, por Cromatografia Gasosa com Detetor por Ionização de Chama - GC-FID, após alteração técnica de um protocolo já existente.
- Implementação do uso de Hidrogénio como gás de arraste (fase móvel), em substituição da utilização de Hélio, na determinação de perfis de ácidos gordos em alimentos, por GC-FID.

O processo de validação decorre das alterações técnicas ao método já existente na Silliker Portugal para a quantificação de colesterol. As alterações técnicas têm como objetivo a eliminação das interferências químicas que podem ocorrer nas amostras com baixos teores de colesterol e acelerar, de forma muito significativa, o tempo de análise de cada amostra.

Para validar este método são realizados ensaios necessários e pertinentes para cada um dos seguintes critérios:

- Precisão (repetibilidade; reprodutibilidade; precisão intermédia)
- Exatidão
- Limite de quantificação
- Gama de trabalho
- Incerteza.

Consistindo, a metodologia, na análise de:

- Amostras analisadas pelo laboratório de Físico-Química da Silliker Portugal.
- Amostras provenientes de ensaios de comparação interlaboratorial.
- Cartas de controlo da plataforma ZETA SAFE.
- Participação em circuitos de comparação interlaboratorial.

Esta metodologia permite estimar todos os parâmetros estabelecidos anteriormente.

Abstract

Knowing the nutritional composition of food products by the consumer is nowadays essential for consumers and required by law, being under the Regulation (EU) No. 1169/2011 established by the European Union.

Thus, there is duly accredited institutions able to determine qualitatively and quantitatively different compounds in various food matrices, which are also responsible, for the process of labeling food products which will arrive to the final consumer.

The present work falls within the context of the completion of a curricular internship included in the Master of Chemistry, Faculty of Science, University of Porto, taking place in the company Silliker Portugal, S.A.

Silliker Portugal, SA, belonging to the multinational group Merieux NutriSciences, the world leader in providing services for the improvement of food quality and safety, offers a wide area of services, such as sensory analysis, food security, consulting, audits, labeling and legislation and microbiological and chemical analysis according to standard NP EN ISO/IEC 17025.

The goals set for this internship were based on two essential points:

- Validation of a methodology for the determination of cholesterol present in food matrices due to technical modification of an existing protocol using Gas Chromatography with Flame Ionization Detector - GC-FID.
- Implementation of the hydrogen used as carrier gas (mobile phase) to replace the use of helium, in the determination of fatty acid profiles in food matrices by GC-FID.

The alteration of the process occurs by applying some technical changes to the already existing method in the company for the quantitation of cholesterol. The technical changes are intended to eliminate chemical interferences that may occur in samples with low cholesterol levels and accelerate significantly the analysis of each sample.

To validate this method necessary and relevant tests for each of the following standards are performed:

- Precision (repeatability; reproducibility; intermediate precision)
- Accuracy
- Limit of quantification
- Working range

- Uncertainty

The methodology consists in the analysis of:

- Samples analyzed by the Physical Chemistry Laboratory of Silliker Portugal.
- Samples from interlaboratorial comparison tests.
- ZETA SAFE platform control charts.
- Participation in interlaboratorial circuits.

This methodology allows to estimate all the parameters established above.

Índice

Resumo	IV
Abstract.....	VI
Índice de tabelas.....	XII
Lista de abreviaturas.....	XVII
1. Introdução	3
1.1 Empresa de acolhimento	3
1.1.1 Mérieux NutriSciences	3
1.2 Enquadramento do estágio e objetivos propostos	6
1.3 Cromatografia Gasosa.....	7
1.3.1 Introdução.....	7
1.3.2 Teoria dos pratos teóricos	11
1.3.3 Teoria cinética de van Deemter	12
1.4 Ácidos gordos.....	15
1.5 Colesterol	20
1.5.1 Colesterol LDL.....	21
1.5.2 Colesterol HDL	21
1.6 Validação de métodos analíticos	23
1.6.1 Elaboração da curva de calibração.....	24
1.6.2 Sensibilidade	24
1.6.3 Gama de trabalho e linearidade.....	24
1.6.4 Robustez	25
1.6.5 Especificidade	25
1.6.6 Limites analíticos (limite de deteção e limite de quantificação) ...	26
1.6.7 Precisão	27
1.6.8 Exatidão	28

1.7	Sistema de controlo interno da qualidade de resultados analíticos	28
1.7.1	Daily Process Control Sample (Amostra de controlo diário do Processo)	29
1.7.2	Cartas de Controlo	29
1.7.3	Amostras cegas	29
1.7.4	Amostras em duplicado	30
2	Execução experimental	34
2.1	Determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos por GC-FID	34
2.1.1	Materiais e reagentes	34
2.1.2	Preparação das soluções	35
2.1.3	Preparação das amostras	36
2.1.4	Procedimento experimental	37
2.2	Substituição da fase móvel do GC na determinação de perfis de ácidos gordos em alimentos, por GC-FID	38
2.3	Determinação do teor de colesterol em alimentos por GC-FID	39
2.3.1	Materiais e reagentes	39
2.3.2	Preparação das soluções	41
2.3.3	Resumo do método	41
2.3.4	Procedimento experimental	41
2.4	Determinação do teor de colesterol em alimentos por GC-FID - Novo método	45
2.4.1	Materiais e reagentes	45
2.4.2	Preparação de soluções	46
2.4.3	Preparação dos padrões	47
2.4.4	Procedimento experimental	47
3	Resultados e discussão	53
3.1	Substituição da fase móvel do GC na determinação de perfis de ácidos gordos em alimentos	53

3.2	Comparação de resultados obtidos com as diferentes fases móveis para a determinação de perfis de ácidos gordos em alimentos	54
3.2.1	Comparação de resultados obtidos com as duas fases móveis – “Vegetable oil”	58
3.2.2	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – “Mixed fat spread”	58
3.2.3	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – “Fish oil”	59
3.2.4	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis - Molho de leitão	60
3.2.5	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis - Azeitona verde	61
3.2.6	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis - Leite meio gordo	61
3.2.7	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – Chouriço	62
3.2.8	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – Bolacha	63
3.2.9	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – Manteiga	64
3.2.10	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis - Conserva de peixe	64
3.2.11	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – Queijo	65
3.2.12	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – Cereais	66
3.2.13	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis hélio-hidrogénio - Prato cozinhado	66
3.2.14	Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – Tosta	67
3.3	Estudo estatístico para as 14 comparações realizadas	68
3.4	Determinação do teor de colesterol em alimentos por GC-FID	70

4	Considerações finais	77
5	Bibliografia.....	79

Índice de tabelas

Tabela 1 - Reagentes utilizados na determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos por GC-FID.....	34
Tabela 2 - Solventes utilizados na determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos por GC-FID.....	34
Tabela 3 - Instrumentação utilizada na determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos por GC-FID.....	35
Tabela 4 - Condições cromatográficas utilizadas na determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos por GC-FID.....	35
Tabela 5 - Apresentação da massa a pesar para cada amostra, em função do teor de massa gorda.....	36
Tabela 6 - Condições cromatográficas utilizadas na determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos por GC-FID, utilizando Hidrogénio como gás de arraste.	39
Tabela 7 - Reagentes utilizados na determinação do colesterol por GC-FID.	39
Tabela 8 - Solventes utilizados na determinação do colesterol por GC-FID ..	40
Tabela 9 - Instrumentação utilizada na determinação do colesterol por GC-FID	40
Tabela 10 - Condições cromatográficas utilizadas na determinação do colesterol por GC-FID	40
Tabela 11 - Reagentes utilizados na determinação do colesterol por GC-FID pelo novo método	45
Tabela 12 - Solventes utilizados na determinação do colesterol por GC-FID pelo novo método	45
Tabela 13 - Instrumentação utilizada na determinação do colesterol por GC-FID pelo novo método	46
Tabela 14 - Condições cromatográficas utilizadas na determinação do colesterol por GC-FID pelo novo método	46
Tabela 15 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de um DPC interno, “vegetable oil”, utilizando o Hélio como gás de arraste.....	58
Tabela 16 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de um DPC interno, , “vegetable oil”, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste	58

Tabela 17 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de um DPC interno, “mixed fat spread”, utilizando o Hélio como gás de arraste 59

Tabela 18 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de um DPC interno, “mixed fat spread”, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste 59

Tabela 19 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de um DPC interno, “fish oil”, utilizando o Hélio como gás de arraste 59

Tabela 20 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de um DPC interno, “fish oil”, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste..... 60

Tabela 21 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de molho de leitão, utilizando o Hélio como gás de arraste..... 60

Tabela 22 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de molho de leitão, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste 60

Tabela 23 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de azeitona verde, utilizando o Hélio como gás de arraste..... 61

Tabela 24 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de azeitona verde, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste 61

Tabela 25 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de leite meio gordo, utilizando o Hélio como gás de arraste..... 62

Tabela 26 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de leite meio gordo, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste 62

Tabela 27 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de chouriço, utilizando o Hélio como gás de arraste 62

Tabela 28 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de chouriço, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste..... 63

Tabela 29 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de bolacha, utilizando o Hélio como gás de arraste 63

Tabela 30 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de bolacha, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste..... 63

Tabela 31 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de manteiga, utilizando o Hélio como gás de arraste 64

Tabela 32 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de manteiga, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste..... 64

Tabela 33 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de conserva de peixe, utilizando o Hélio como gás de arraste 64

Tabela 34 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de conserva de peixe, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste 65

Tabela 35 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de queijo, utilizando o Hélio como gás de arraste 65

Tabela 36 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de queijo, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste 65

Tabela 37 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de cereais, utilizando o Hélio como gás de arraste 66

Tabela 38 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de cereais, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste..... 66

Tabela 39 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de um prato cozinhado, utilizando o Hélio como gás de arraste 66

Tabela 40 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de um prato cozinhado, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste 67

Tabela 41 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de uma tosta, utilizando o Hélio como gás de arraste 67

Tabela 42 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de uma tosta, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste..... 67

Tabela 43 - Resultados obtidos para os cinco testes aplicados a 14 amostras diferentes..... 68

Índice de figuras

Figura 1 – Esquema representativo dos serviços apresentados pela Mérieux NutriSciences	4
Figura 2 - Esquema representativo da estrutura da Silliker Portugal	5
Figura 3 - Esquema representativo de um sistema cromatográfico	9
Figura 4 - Exemplo de um cromatograma obtido por cromatografia gasosa..	10
Figura 5 - Esquema representativo dos parâmetros de retenção	10
Figura 6 - Gráfico de van Deemter, mostrando a contribuição dos termos A, B e C.....	14
Figura 7 - Estrutura química do ácido palmítico. Exemplo de um ácido gordo saturado.....	15
Figura 8 - Estrutura química de uma molécula de colesterol	20
Figura 9 - Imagem representativa da alteração técnica aplicada ao cromatógrafo	38
Figura 10 - Cromatograma obtido por GC-FID para uma amostra de uma conserva de peixe, utilizando Hélio como fase móvel para a determinação de perfis de ácidos gordos	53
Figura 11 - Cromatograma obtido por GC-FID para uma amostra de uma conserva de peixe, utilizando Hidrogénio como fase móvel para a determinação de perfis de ácidos gordos	54
Figura 12 - Cromatograma obtido por GC-FID para a determinação do teor de colesterol presente num DPC interno	70
Figura 13 - Cromatograma do padrão interno obtido com as novas condições cromatográficas	71
Figura 14 - Cromatograma obtido por GC-FID para a determinação do teor de colesterol presente numa amostra de azeite não contaminado.....	72
Figura 15 - Cromatograma obtido por GC-FID para a determinação do teor de colesterol presente numa amostra de azeite contaminado	73

Lista de abreviaturas

DPCs – *Daily Process Control Sample* (Amostra de controlo diário de processos)

FAME – *Fatty acid methyl esters* (Ésteres de metilo de ácidos gordos)

FDA – *Food and Drug Administration*

FID – *Flame Ionization Detector* (Detetor de ionização de chama)

GC – *Gas chromatography* (Cromatografia gasosa)

HETP – *Height Equivalent to a Theoretical Plate* (Altura equivalente a um prato teórico)

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia gasosa de alta eficiência)

HDL – *High Density Lipoproteins* (Lipoproteínas de alta densidade)

LD_c – Limite de deteção do método analítico

LQ_c – Limite de quantificação do método analítico

LDL – *Low Density Lipoproteins* (Lipoproteínas de baixa densidade)

NP – Norma portuguesa

OMS – Organização Mundial de Saúde

UE – União Europeia

Introdução

Capítulo 1

1. Introdução

1.1 Empresa de acolhimento

1.1.1 Mérieux NutriSciences

A Mérieux NutriSciences é uma empresa multinacional desenvolvida pelo Institut Mérieux para responder à crescente necessidade da existência de controlo de qualidade a nível alimentar, contribuindo para a segurança alimentar dos consumidores finais destes produtos alimentares. Através de análises físico-químicas, é possível determinar detalhadamente a composição de cada alimento. Desta forma, e aliando-se a uma componente de responsabilidade pela rotulagem, é possível garantir a qualidade dos produtos ingeridos. À medida que vai ajudando na promoção da saúde pública, a Mérieux NutriSciences contribui para o avanço da ciência e da resolução das dificuldades colocadas à indústria através de uma abordagem uniforme da qualidade.

Com 50 anos de experiência em segurança e qualidade alimentar, por intermédio da Silliker, uma empresa criada em 1967 e adquirida pela Mérieux NutriSciences em 1997, esta conquistou a confiança da indústria alimentar e estendeu a sua experiência para outros setores industriais, nomeadamente: Água e Meio Ambiente, Farmacêutica e Dispositivos Médicos, Higiene Pessoal e Cosmética, Agroquímicos e Bens de Consumo (Figura 1).

A empresa tem crescido rapidamente nos últimos anos, estando hoje presente em 21 países com mais de 80 laboratórios. A Mérieux NutriSciences está a aumentar a sua presença nos países emergentes, em particular na China, Brasil, Turquia, África do Sul e Índia, com o objetivo de responder as crescentes exigências desses mercados.¹

As análises químicas, biológicas e bioquímicas são realizadas por uma rede internacional de laboratórios acreditados, cada um com um conhecimento profundo das necessidades globais e locais, dentro de um quadro regulamentar em constante evolução. O objetivo principal passa por garantir a qualidade e segurança dos alimentos desde o desenvolvimento até ao cliente final.²

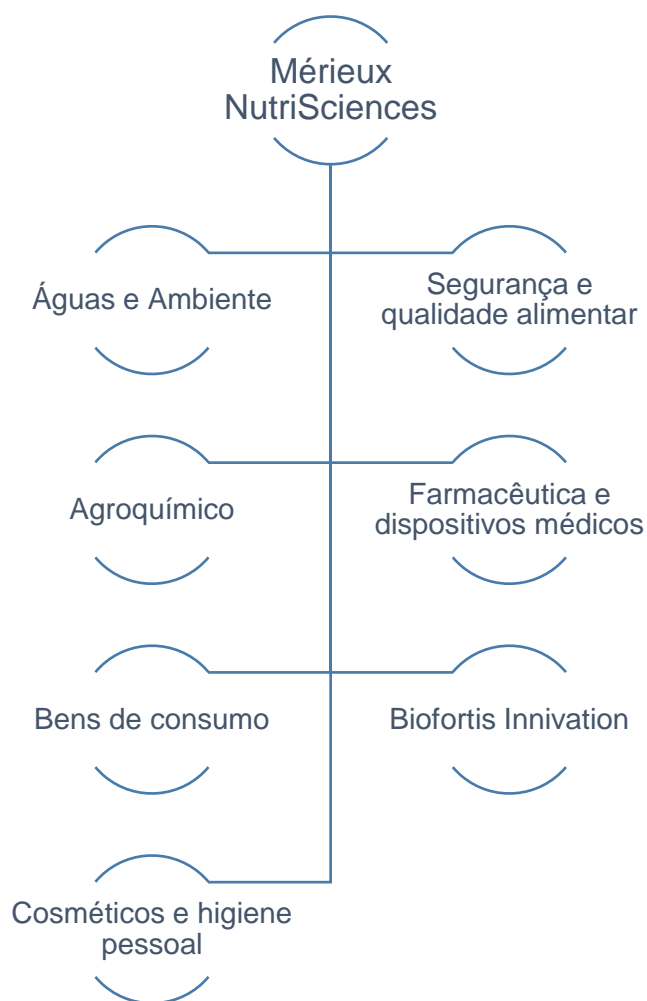


Figura 1 – Esquema representativo dos serviços apresentados pela Mérieux NutriSciences

1.1.1. Silliker Portugal

A Silliker Portugal, S.A. é uma empresa independente de prestação de serviços para o sector agro-alimentar fundada em 1993 que foi integrada em 2008 no grupo Silliker, líder mundial na prestação de serviços para a melhoria da qualidade e segurança alimentar.

A empresa encontra-se, de momento, capaz de oferecer uma ampla gama de serviços, onde se inclui o serviço de análises microbiológicas, químicas e sensoriais, consultadoria em segurança alimentar, auditorias, rotulagem e legislação (Figura 2).

Para garantir a competência prometida, a empresa estabelece políticas e procedimentos de trabalho que visem assegurar a qualidade do serviço prestado ao cliente. Exemplo disso é a garantia que todos os ensaios realizados sejam sempre

executados de acordo com os métodos estabelecidos, com os requisitos dos clientes e segundo o referencial normativo NP EN ISO/IEC 17025.³

A Silliker Portugal S.A., conta com muitos tipos de operações que abrangem diversas áreas do sector agro-alimentar: carnes e derivados, lacticínios, óleos e gorduras alimentares, frutos e produtos hortícolas, conservas, cereais e leguminosas, bebidas, gelados, condimentos e especiarias, produtos de pastelaria, pescado e derivados, alimentos para animais entre outros, providenciando resultados válidos relativos à informação nutricional, controlo de aditivos, controlo de conservantes, controlo de riscos alergénicos, avaliação da conformidade do material para contacto com alimentos e ensaios físicos em embalagens.

Dentro da empresa, existe uma divisão laboratorial, sendo que cada laboratório se responsabiliza por setores diferentes de análise. Nesta divisão tripartida podemos então diferenciar o Laboratório de Físico-Química, onde se realizam as técnicas de análise mais clássicas, o Laboratório de Métodos Instrumentais de Análise onde são realizadas essencialmente as técnicas cromatográficas e espectrofotométricas e o Laboratório de Microbiologia, que fornece as análises microbiológicas.⁴

A diversidade de análises realizadas nos laboratórios permite fornecer uma informação global, detalhada e completa sobre qualquer matriz alimentar. Esta capacidade por parte da empresa para a prestação de um serviço completo e acima do satisfatório é a razão do sucesso da mesma e o que lhe permite manter-se no topo a nível nacional.



Figura 2 - Esquema representativo da estrutura da Silliker Portugal

1.2 Enquadramento do estágio e objetivos propostos

Este estágio de 9 meses – com início a 1 de Outubro de 2015 e término a 31 de Junho de 2016 – encontra-se inserido no âmbito da realização de um estágio curricular em contexto empresarial, enquadrado no plano de estudos do Mestrado de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Um dos objetivos inicialmente delineados para este estágio passava pela validação de uma metodologia para a determinação de colesterol presente em alimentos, por Cromatografia Gasosa com Detetor por Ionização de Chama (GC-FID). Esta validação surge devido à necessidade de incutir alterações técnicas ao método já existente na Silliker Portugal para a quantificação de colesterol. Tal necessidade surgiu, uma vez que alterações técnicas a implementar permitem a eliminação das interferências químicas que podem ocorrer nas amostras com baixos teores de colesterol. Para além disso, permitem também diminuir, de forma significativa, o tempo de análise de cada amostra.

A validação deste método requer a realização dos ensaios necessários e pertinentes para cada um dos seguintes critérios:

- Precisão (repetibilidade; reprodutibilidade; precisão intermédia)
- Exatidão:
- Limite de quantificação
- Gama de trabalho
- Incerteza.

Tais critérios podem ser determinados através da análise de amostras realizadas pelo laboratório de Físico-Química da Silliker Portugal e amostras provenientes de ensaios de comparação interlaboratorial; da realização de Cartas de Controlo da plataforma interna ZETA SAFE e da participação em circuitos de comparação interlaboratorial.

Outro objetivo primordial seria também a implementação do uso de Hidrogénio como gás de arraste (fase móvel), em substituição da utilização de Hélio, na determinação de perfis de ácidos gordos em alimentos, por GC-FID.

O cumprimento deste objetivo dependeria da obtenção de resultados satisfatórios nos estudos de comparação, realizados internamente, que opõem os valores obtidos utilizando o Hélio como fase móvel do GC com os valores obtidos após a sua substituição pelo Hidrogénio.

A avaliação global dependeria das diferenças dos resultados obtidos com os dois gases utilizados.

1.3 Cromatografia Gasosa

1.3.1 Introdução

A cromatografia gasosa é uma técnica sofisticada capaz de separar misturas muito complexas de espécies químicas voláteis, que utiliza uma fase móvel gasosa para o transporte da amostra através da coluna que contém a fase estacionária. Apesar de existirem diversas combinações possíveis e de fatores que variam conforme as amostras que se pretende analisar, o mecanismo geral de funcionamento é semelhante em todos os cromatógrafos.

Um gás de arraste inerte, tal como hélio, é alimentado a partir de cilindros de gás para o aparelho, onde a pressão é regulada utilizando controladores de pressão manuais ou pneumáticos. Este gás, a fase móvel, é fornecido à entrada do aparelho, a partir da qual flui através da coluna até chegar ao detetor. A amostra é então injetada no injetor, onde é aquecida até se volatilizar. A partir daí, esta é separada no interior da coluna. A separação ocorre por partição diferencial dos analitos entre a fase móvel e estacionária, com base na pressão de vapor relativa e na solubilidade na fase estacionária líquida imobilizada. Cada um dos componentes da amostra divide-se entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida, sendo que esta se encontra geralmente revestida sobre a parede interna da coluna.⁵

A separação é provocada por taxas de migração diferentes entre os compostos devido às diferentes interações com a fase estacionária. Esta separação é acompanhada por processos de dispersão, durante o transporte através da coluna, o que causa um alargamento das bandas de substâncias, o que não permite uma boa separação, uma vez que os picos largos impedem a obtenção de uma boa resolução dos picos mais próximos. Consequentemente, o objetivo principal da cromatografia consiste em maximizar as diferenças nas taxas de migração e minimizar a dispersão dos compostos escolhendo parâmetros de funcionamento apropriados.⁷

A taxa de migração de um composto consiste na soma da taxa de transporte através da coluna com o seu tempo de retenção na fase estacionária. O tempo gasto na fase móvel é a mesma para todos os componentes da amostra, mas o tempo de retenção é específico para cada composto.⁷ A taxa de migração baseia-se, então, na distribuição de um analito entre a fase estacionária e a fase móvel e é expressa pelo

coeficiente de partição, K_c , que mede a tendência de uma substância para ser atraída pela fase estacionária. Elevados valores de K_c correspondem a tempos de retenção de analitos mais longos. É possível calcular o valor do coeficiente de partição a partir da expressão:

$$K_c = \frac{C_s}{C_m}$$

C_s : Concentração de um composto na fase estacionária

C_m : Concentração de um composto na fase móvel

Uma separação só é bem-sucedida se as constantes de distribuição dos componentes da amostra forem diferentes. Quando maior o K_c , mais tempo o composto permanece na fase estacionária e mais lenta é a taxa de migração global através da coluna.

Se um composto, A, tem menos afinidade com a fase estacionária do que um outro composto, B, é transportado através da coluna mais rapidamente do que o composto B, que fica mais tempo retido na fase estacionária. Desta forma, a separação pretendida é alcançada. Em cromatografia gasosa, uma melhor separação do analito é obtida através da otimização das diferenças de afinidade entre os compostos e a fase estacionária e das pressões de vapor relativas dos analitos. Na prática, estes parâmetros são manipulados por alteração da natureza química da fase estacionária e a temperatura da coluna.⁵

Todo o processo de separação ocorre dentro de um forno do cromatógrafo, que é capaz de produzir elevadas variações de temperatura, sendo que esta varia, geralmente, de 5°C a 400°C. O forno tem a capacidade de, não só aquecer rapidamente, mas também arrefecer rapidamente, uma vez que existe também uma ventoinha e um sistema de ventilação, geralmente na parte de trás do forno. Para além da coluna, as ligações do injetor e do detetor também estão contidos no interior do forno. Estas características possibilitam a existência de um controlo térmico bastante otimizado.⁵

Na eluição a partir da coluna, o gás de arraste e os analitos passam para um detetor, que responde a uma propriedade físico-química da amostra a analisar e gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de analito presente.

Existem diversos tipos de detetor que podem ser acoplados a um cromatógrafo para análises por cromatografia gasosa. Neste caso, o detetor utilizado foi o FID, ou detetor por ionização de chama. O FID é um dos detetores mais utilizados em cromatografia gasosa. Os compostos orgânicos que eluem da coluna são queimados através de uma chama de hidrogénio/ar e, através de um conjunto de reações complexas, quase todos os átomos de carbono são convertidos em CH_4 , que é, posteriormente, oxidado a CO_2 . Durante este processo, uma pequena fração de átomos de carbono é transformada em CHO^+ , que gera uma pequena corrente elétrica entre dois eléctrodos. O FID deteta praticamente todos os compostos contendo carbono, com a exceção de um número limitado de moléculas pequenas, tais como monóxido de carbono, dióxido de carbono, ácido fórmico e formaldeído.⁶

Na figura 3, encontra-se representada a constituição de um sistema cromatográfico.

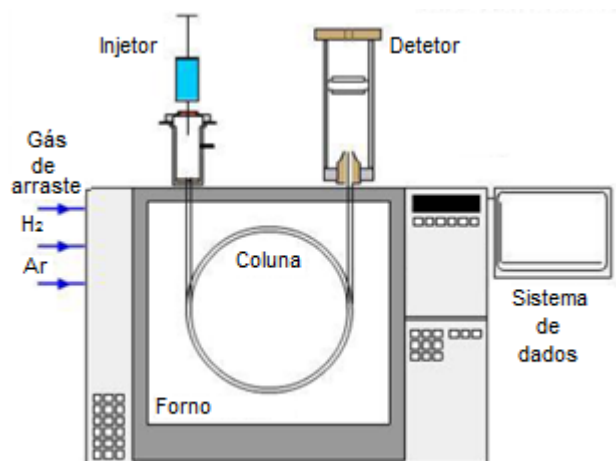


Figura 3 - Esquema representativo de um sistema cromatográfico

O sistema de dados recebe o sinal analógico a partir do detetor e digitaliza-o para formar o registo gráfico da separação cromatográfica, ou seja, o cromatograma. Este sistema pode também ser usado para executar várias operações quantitativas e qualitativas no cromatograma, contribuindo para a identificação da amostra e a sua quantificação.⁵

Como já foi referido, à medida que os compostos da mistura eluem da coluna, passam para um detetor, onde uma propriedade físico-química da amostra a analisar produz uma resposta desse detetor. Esta resposta é, então, amplificada e representada graficamente em função do tempo, dando origem a um cromatograma (Figura 4).

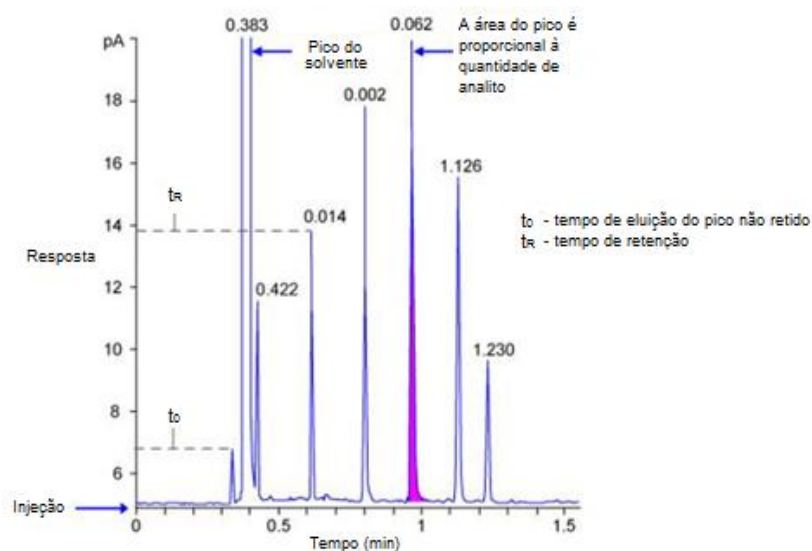


Figura 4 - Exemplo de um cromatograma obtido por cromatografia gasosa

Compostos como o solvente de injeção, que não são retidos dentro coluna, eluem no chamado "tempo morto", t_0 . Existem várias maneiras de medir esse parâmetro usando compostos não retidos, como o metano ou hexano.

Os tempos de retenção (Figura 5) fornecem o aspeto qualitativo do cromatograma e o tempo de retenção de um composto será sempre o mesmo em condições cromatográficas idênticas.

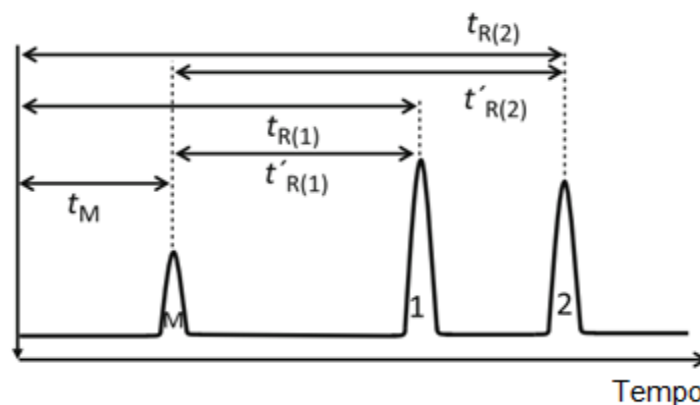


Figura 5 - Esquema representativo dos parâmetros de retenção

$t_{R(1)}$: tempo total de retenção do composto 1.

t_M , t_0 : Tempo morto, o tempo necessário para eluir um composto que não é retido pela fase estacionária (tempo gasto na fase móvel).

$t'_{R(1)}$: Tempo de retenção ajustado do composto 1 (tempo gasto na fase estacionária).

$$t'_{R(1)} = t_R - t_M$$

Como já foi mencionado anteriormente, a separação cromatográfica da mistura baseia-se na diferente distribuição dos componentes entre a fase estacionária e a fase móvel. Uma concentração mais elevada na fase estacionária resulta numa maior retenção do respetivo soluto na fase estacionária.

A área do pico cromatográfico está diretamente relacionada com a quantidade de analito presente. Para a determinação da quantidade real do composto, a área ou a altura são então comparadas com padrões de concentração conhecida.⁵

1.3.2 Teoria dos pratos teóricos

A teoria dos pratos foi introduzida pela primeira vez em cromatografia por James e Martin em 1952. Este conceito provém da ideia de funcionamento das colunas de destilação e consiste na divisão do processo contínuo de separação numa série de passos individuais.

Assim, a coluna é constituída por vários segmentos consecutivos, chamados pratos teóricos, e para cada um dos pratos, é assumido um equilíbrio entre o soluto na fase estacionária e na fase móvel.

Quanto menor for um segmento ou a altura do prato teórico, maior é o número de pratos disponíveis por metro de coluna. Por conseguinte, mais passos de distribuição pode ser realizados, o que resulta num menor alargamento relativo da banda, em relação ao comprimento da coluna.

O número de pratos teóricos, N , e a altura de um prato, H , são obtidos a partir do cromatograma, utilizando o tempo de retenção, t_R , de um soluto de teste e a largura do pico:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2$$

onde σ é o desvio padrão, w_b é a largura do pico na base. N pode também ser calculado pela expressão:

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

onde w_h é a largura do pico a meia altura.

A conversão entre as diferentes alturas dos picos assume um pico de Gauss. A altura do prato, H , é obtida dividindo o comprimento da coluna, L , pelo número de pratos, N :

$$H = L/N$$

A altura do prato também é muitas vezes denominada por altura equivalente a um prato teórico, HETP. A altura do prato é um critério importante para avaliar a eficiência de uma coluna e pode ser utilizado para comparar colunas. Colunas de alta qualidade são caracterizadas por possuírem um elevado N e um baixo H , isto é, um elevado número de pratos, com menor altura.

No entanto, ambos os valores dependem da temperatura da coluna, da velocidade média do gás de arraste e do soluto e são determinados em condições isotérmicas.

Embora a teoria dos pratos proporcione um valor para avaliar a eficiência de uma coluna, não explica o alargamento dos picos. Este feito foi conseguido pela primeira vez com a teoria cinética de van Deemter.

1.3.3 Teoria cinética de van Deemter

A teoria cinética foi introduzida por van Deemter e descreve o processo de separação que ocorre numa coluna de GC sob condições isotérmicas como um processo dinâmico de processos de transferência de massa e difusão independente, que são responsáveis pelo alargamento da banda.

A difusão molecular descreve o movimento aleatório das moléculas em fluidos, como gases ou líquidos. Se o movimento é impulsionado por diferenças de concentração, é denominado de difusão simples.

Neste caso, as moléculas movem-se a partir das regiões de elevada concentração para regiões de baixa concentração, até que a diferença de concentração seja equilibrada. A taxa deste movimento é diretamente proporcional ao gradiente de concentração e em sistemas binários é expressa como coeficiente de difusão, D (m^2/s). O coeficiente de difusão dos gases varia entre 10^{-4} e $10^{-5} \text{ m}^2 / \text{s}$, e 4-5 ordens de grandeza inferior em líquidos ($10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$).

A equação de van Deemter descreve a relação entre a altura de um prato teórico, H , e a velocidade linear média da fase móvel. Na forma condensada é expressa da seguinte maneira:

$$H = A + \frac{B}{\bar{\mu}} + C\bar{\mu}$$

H : Altura de um prato teórico

$\bar{\mu}$: velocidade linear média da fase móvel

A : termo de difusão de Eddy

B : Termo de difusão longitudinal

C : Termo de transferência de massa

Os termos A (ampliação da banda causada por efeitos de dispersão, que é um fenómeno denominado por difusão de Eddy), B (alargamento da banda por difusão longitudinal), e C (alargamento da banda causado pelo atraso do soluto, devido à transferência de massa) representam a contribuição dos processos que contribuem para o alargamento da banda e devem ser mantidos tão baixos quanto possível.

A partir da equação de van Deemter, é possível tirar várias conclusões de enorme importância para a aplicação prática. A Figura 6 mostra que a altura do prato depende da velocidade linear média da fase móvel.

A curva $\frac{H}{u}$ é uma hipérbole, em que o valor mínimo para H corresponde ao valor de u no ponto $u_{ot} = \sqrt{\frac{B}{C}}$.

Assim, verifica-se que existe uma velocidade linear média ótima da fase móvel para cada coluna, através da qual é alcançada a maior eficiência da coluna, isto é, são alcançados os picos mais estreitos.

O valor mínimo de H é o resultado de diferentes dependências dos termos A, B, e C sobre a velocidade da fase móvel. O termo A é independente da velocidade. O termo B diminui com o aumento da velocidade, uma vez que o impacto da difusão longitudinal é menos acentuado em taxas de fluxo mais elevadas. O termo C aumenta com o aumento da velocidade média linear.

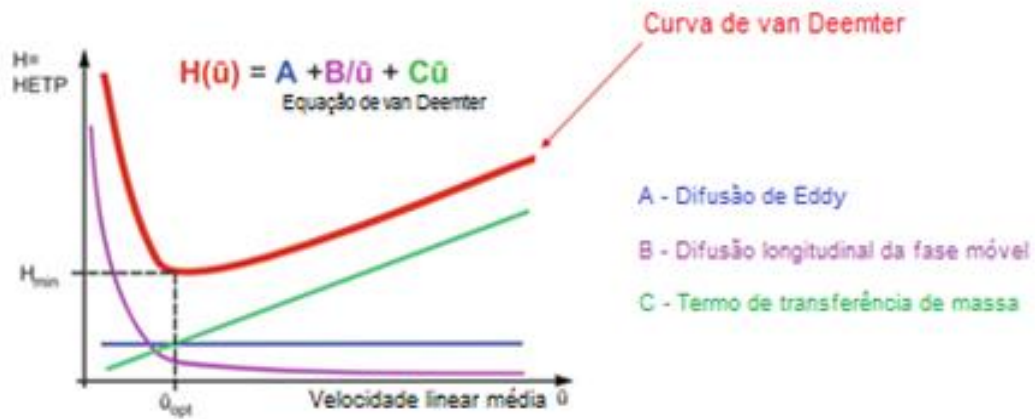


Figura 6 - Gráfico de van Deemter, mostrando a contribuição dos termos A, B e C

1.4 Ácidos gordos

Gorduras e óleos alimentares consistem em triglicéridos, que libertam ácidos gordos livres através da hidrólise. Os ácidos gordos, os *building blocks* de gorduras e óleos, são os ácidos compostos por uma cadeia alifática monocarboxílica não ramificada, normalmente com número de carbonos par (4-24 átomos de carbono), embora as cadeias com número ímpar de carbonos possam também ser encontradas na natureza, por exemplo, em leite de ruminantes (C5-C11) e lípidos de certas espécies bacterianas (C13-C19).

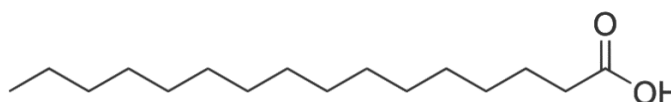


Figura 7 - Estrutura química do ácido palmítico. Exemplo de um ácido gordo saturado

A classificação dos ácidos gordos é feita de acordo com a existência, ou não, de ligações duplas na cadeia hidrocarbonada e de acordo com a conformação apresentada, que pode ser *cis* ou *trans*. A cadeia alifática pode ser saturada, onde todas as ligações C-C são ligações simples e todas as outras ligações de carbono são ligações C-H, ou insaturada, em que pelo menos dois átomos de carbono estão ligados por ligações duplas.

Um conjunto crescente de pesquisas sugere que ácidos gordos mono-insaturados e poli-insaturados ajudam na diminuição dos níveis de colesterol no sangue e na redução de fatores de risco cardiovascular enquanto ácidos gordos saturados, e em conformação *trans*, têm efeitos opostos. Muitos ácidos gordos poli-insaturados são considerados nutrientes essenciais, e que podem apenas ser obtidos através da alimentação. Exemplos bem conhecidos deste tipo de ácidos gordos são o omega-3 e o omega-6, que contêm várias ligações duplas, sendo que, a primeira ligação dupla se encontra no terceiro e sexto carbono a contar da extremidade que contém o grupo metilo, respetivamente.

Encontrados principalmente em óleos de peixe e sementes de plantas, estes ácidos gordos poli-insaturados demonstraram fornecer uma série de outros potenciais benefícios para a saúde, para além dos seus benefícios cardiovasculares, incluindo propriedades anti-cancerígenas, anti-inflamatórias, e antioxidantes.

Por conseguinte, existe um rápido crescimento na área da química alimentar para a determinação de perfis de ácidos gordos de diferentes fontes alimentares.

A American Oil Chemists' Society recomendou a cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama, GC-FID, como o método padrão para a determinação de ácidos gordos, uma vez que este oferece excelente desempenho quantitativo.⁹

Geralmente, em cromatografia gasosa, a deteção de ácidos gordos é facilitada pela conversão desses compostos nos seus derivados éster de metilo, FAMEs, recorrendo a vários possíveis métodos de esterificação. Neste caso, recorreu-se ao método de derivatização, na qual os ácidos gordos são esterificados com o catalisador ácido BF_3 , com os FAMEs formados a serem posteriormente analisados por CG-FID.¹⁰

Os ácidos gordos *trans*, de acordo com a definição FDA, Food and Drug Administration, são ácidos gordos insaturados que contêm uma ou mais ligações duplas isoladas numa configuração *trans*. Gordura *trans* em produtos alimentares provem, principalmente, de óleo parcialmente hidrogenado. No entanto, é encontrada também em menores quantidades em produtos lácteos e carnes de ruminantes devido à biohidrogenação que ocorre no seu estômago.

Os riscos para a saúde devido à gordura *trans* têm sido debatidos por muitos anos. Estudos epidemiológicos revelaram a sua associação com o nível mais alto de colesterol total no plasma. O consumo de gordura *trans* pode aumentar o risco de doença cardíaca coronária. Consequentemente, a FDA emitiu uma regra que obriga à inclusão a gordura *trans* na informação nutricional dos alimentos, a partir de janeiro de 2006.

Esta regra solicita a urgente necessidade de otimizar o método para a análise de ácidos gordos *trans* em produtos alimentares. A análise dos ácidos gordos *trans* é extremamente desafiadora e complexa, devido à existência de uma ampla gama de isómeros posicionais de *mono*enos, *di*enos, e *tri*enos. Os métodos analíticos incluem, principalmente, espectroscopia de infravermelho, de ^{13}C RMN, cromatografia gasosa, cromatografia de camada fina, HPLC e espectrometria de massa ou uma combinação entre eles.¹¹

As principais causas de morte nas sociedades ocidentais, tais como doenças cardiovasculares degenerativas e cancro, estão diretamente relacionadas com a ingestão de gorduras.

As leis de rotulagem nutricional, na maior parte dos países, exigem que todos os alimentos processados sejam analisados para a determinação da presença de vários

tipos de ácidos gordos mono e poli-insaturados e que os resultados sejam relatados aos consumidores. O consumo de ácidos gordos trans está ligado a um nível mais elevado de colesterol LDL e um nível inferior de colesterol HDL no plasma.

A relação entre os ácidos gordos omega-6 e omega-3 na dieta ocidental é na gama de 10-30:1, o que é reconhecido por muitos nutricionistas como insuficiente e responsável por distúrbios de saúde.

Verificou-se que, enriquecendo a dieta de um grupo de animais com ómega-3, resultou numa maior quantidade de ómega-3 presente em lipídios nos produtos alimentares provenientes desses animais, em comparação com o grupo controlo de animais que foram alimentados normalmente. Além disso, nos últimos anos, foram comercializados muitos produtos de origem animal com ómega-3, com diferentes índices e diferentes tipos de ómega-3. Isto enfatiza a importância da determinação do perfil de ácidos gordos de alimentos para a rotulagem nutricional correta e também do controlo da autenticidade da rotulagem.¹²

Obesidade e fatores de risco cardiometabólico podem ocorrer logo na infância e desenvolver-se em doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 mais tarde na vida. Desta forma, é importante estudar os indícios precoces de possível risco cardiometabólico.

Ácidos gordos poli-insaturados têm recebido considerável interesse neste contexto, devido aos seus diversos papéis na síntese de membrana celular e expressão génica. Contrariamente aos ácidos gordos saturados e monoinsaturados, os ácidos gordos poli-insaturados, omega-3 e omega-6, não podem ser sintetizados pelo corpo humano sendo, portanto, considerados nutrientes essenciais para a nossa alimentação.

Durante a gravidez e lactação, os ácidos gordos poli-insaturados são transferidos da mãe para o feto ou recém-nascido. Este tipo de ácidos gordos são importantes para o nosso crescimento e desenvolvimento, à medida que são incorporados em membranas celulares de todos os tecidos do corpo. A importância da ingestão de ácidos gordos poli-insaturados durante a gravidez e na infância tem sido amplamente estudada em relação ao cognitivo da criança e desenvolvimento visual.

A presença de ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa no leite materno tem sido sugerido como um potencial mecanismo para os efeitos benéficos da amamentação sobre os resultados de saúde subsequentes, como uma pressão arterial mais baixa.¹³

Ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa são, também, os principais componentes de moléculas de lípidos complexos e também estão envolvidos em numerosos processos biológicos críticos.

Ao contrário das proteínas e dos hidratos de carbono, que geralmente têm estruturas com base em longas cadeias de aminoácidos (polipeptídeos) ou açúcares (polissacarídeos), os lípidos são um leque muito mais diversificado de compostos com variações consideráveis na estrutura. No entanto, apesar dos lípidos não serem compostos por "*building blocks*", ácidos gordos apresentam-se como os componentes base de inúmeras classes de lípidos.

Todos os ácidos gordos desempenham papéis importantes em processos biológicos fundamentais, incluindo o fornecimento de energia, estrutura e funções das membranas biológicas.

Alguns ácidos gordos, especialmente ácidos gordos poli-insaturados e os seus derivados, possuem uma enorme atividade biológica e estão envolvidos na sinalização e regulação do metabolismo lipídico, resposta inflamatória e divisão celular. Ácidos gordos saturados e mono-insaturados podem ser sintetizados por todos os organismos, enquanto os poli-insaturados têm de ser obtidos através da alimentação.

Há evidências consistentes de efeitos adversos para a saúde provocados por ácidos gordos trans, particularmente doenças coronárias, cancro e diabetes. Por outro lado, não há relatórios referentes a qualquer impacto benéfico para a saúde.

Têm vindo a ser implementadas diferentes abordagens para reduzir a quantidade de ácidos gordos trans em alimentos processados.

Foram implementadas limites ao teor de ácidos gordos trans industrializados, em alguns países, como na Dinamarca desde 2003, seguidos pela Áustria, Suíça, Islândia, Noruega, Hungria, Suécia e, mais recentemente, Letónia e Geórgia, enquanto outros impuseram a rotulagem obrigatória (Estados Unidos e Brasil., por exemplo), ou incluíram recomendações para a sua voluntária redução, acompanhadas de recomendações nutricionais e programas de sensibilização sobre os efeitos adversos da gordura *trans*.

A OMS publicou, recentemente, um relatório, destacando os benefícios e a importância de uma proibição de gordura *trans* na Europa, seguido por uma declaração apresentada por um grupo de organizações da sociedade civil e operadores da indústria alimentar apoiando a ideia de estabelecer um limite legal. Além disso vários Estados membros da UE têm, também, unido esforços para a solicitação da Comissão Europeia,

para que esta considere a imposição de um possível quadro regulamentar para a redução da gordura *trans*.

Várias pesquisas têm sido asseguradas em diferentes países, com o objetivo de esclarecer as quantidades de gordura *trans* ingerida por diferentes populações no mundo inteiro. O primeiro e mais amplo estudo realizado com tal objetivo, foi o estudo TRANSFAIR, que teve lugar entre 1980 e 1996 e envolveu 14 países europeus, Portugal incluído. Este estudo estimou ingestões diárias desde 1,2 g na Grécia e na Itália a 6,7 g na Islândia, com alta variabilidade entre países, grupos de alimento, e até mesmo os sexos.¹⁴

Uma década mais tarde, e com base em duas pesquisas datadas de 2005 a 2009, concluiu-se que houve uma redução geral. No entanto, o consumo de gordura *trans* era, ainda, potencialmente elevada em algumas populações.

O Parlamento Europeu determinou que, até 13 de Dezembro de 2014, os dados sobre a presença de gorduras *trans* na alimentação geral da população da UE deveria ser conhecida, a fim de implementar medidas adequadas para a sua redução. Simultaneamente, o Plano de Ação Europeu de Alimentação e Nutrição 2015-2020, concentrou-se numa redução de doenças relacionadas com a alimentação, incluindo uma intervenção prioritária na eliminação de gordura *trans*, que deve ser limitada a < 1% do consumo diário de energia, incluindo os de origem natural.

Uma declaração de Viena sobre nutrição e doenças não transmissíveis, convocou o compromisso geral de todos os membros da UE a tomar medidas decisivas em relação a alimentos mais saudáveis, incluindo uma redução de produtos com quantidades elevadas de gordura *trans* e aplicação de abordagens comuns para promover a reformulação de produtos. Em Portugal, apenas foram aplicadas recomendações para a redução voluntária.

No entanto, embora o estudo TRANSFAIR tenha posicionado Portugal entre os países com os mais baixos índices gordura *trans* na década de noventa, um inquérito realizado em 2005 apresentou um panorama pior, com até 43% de gordura *trans* presente na gordura dos alimentos selecionados.

As duas principais indústrias de margarinas e gorduras em Portugal assinaram um compromisso de reduzir a gordura *trans* nos seus produtos em 1995. No entanto, apesar da redução visível em 2002, 80% das amostras foram ainda preparadas com gorduras hidrogenadas ou parcialmente hidrogenadas.¹⁵

1.5 Colesterol

O colesterol é um ácido policíclico de cadeia longa, que pertence à família dos esteróis.

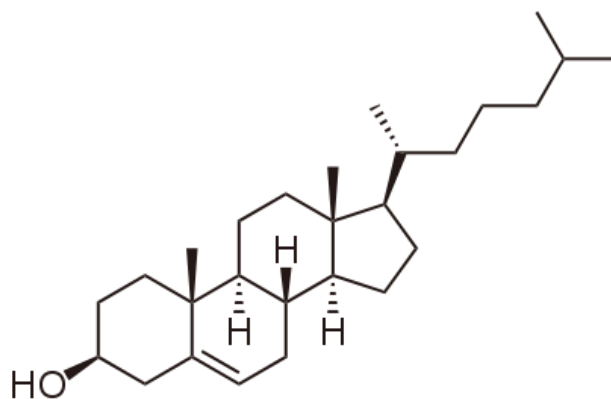


Figura 8 - Estrutura química de uma molécula de colesterol

Este composto orgânico desempenha um papel essencial na manutenção da integridade da membrana e da sua apropriada fluidez. É um componente abundante das membranas plasmáticas de células eucarióticas, constituindo cerca de 25-30% do total dos lípidos presentes nas membranas celulares. A presença de colesterol das membranas celulares é altamente regulada e têm um impacto sobre a permeabilidade da célula. A região hidrofóbica do colesterol encaixa-se nos espaços que existem entre os fosfolípidos, impedindo assim a difusão de moléculas solúveis em água através da membrana.

Para além disso, o colesterol reduz a fluidez das membranas celulares, com a sua estrutura rígida e contribui para a sua estabilização.^{16,17}

Em adição ao papel na estabilidade e estrutura da membrana, o colesterol é também um precursor para a biossíntese de ácidos biliares, vitamina D, hormonas esteroides e em mamíferos.¹⁶

De um ponto de vista nutricional, o colesterol não é encontrado em quantidades significativas em fontes vegetais, encontrando-se, principalmente, presente nos alimentos de origem animal como queijo, ovo, carne de vaca, carne de porco, aves, peixe e camarão.

No que diz respeito a valores de referência para a ingestão de colesterol, a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar decidiu não propor uma referência sobre a ingestão de colesterol. No entanto, a OMS e a Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas estabeleceram recomendações para um consumo máximo de colesterol de 300 mg, por dia, para a população adulta.

Em Portugal, para crianças abaixo de 15 anos de idade, a ingestão média de colesterol variou entre 360 e 378 mg/dia, para jovens do sexo feminino e masculino, respetivamente. Entre os adultos portugueses, os valores variaram de 302 mg/dia a 324 mg/dia, para o sexo feminino e masculino, respetivamente.¹⁷

1.5.1 Colesterol LDL

Em partículas de LDL, o colesterol é responsável por aproximadamente 50% do seu peso total, ao passo que cerca de 25% do peso total corresponde a proteínas. O núcleo das partículas de LDL é altamente hidrofóbico e contém principalmente triglicéridos e colesterol esterificado por vários ácidos gordos. A função básica das LDL é o transporte do colesterol até às células para a realização de funções de armazenamento ou biogénese. Este processo ocorre por endocitose mediada por recetores e envolve a absorção de toda a partícula de lipoproteína.

Especialmente durante os períodos de rápido crescimento e desenvolvimento, as partículas de LDL fornecem colesterol à maior parte dos tecidos periféricos através dos recetores de LDL. Apesar desta importante função, níveis elevados de colesterol LDL no sangue, estão fortemente relacionados com aumento de riscos cardiovasculares. Por esta razão, o colesterol LDL é vulgarmente chamado "~~mau~~ colesterol mau".¹⁶

1.5.2 Colesterol HDL

Ao contrário do LDL, o colesterol HDL é conhecido como "colesterol bom" devido à sua forte relação de proporcionalidade inversa com o risco de doenças cardiovasculares. As partículas de HDL desempenham um papel principal na remoção de colesterol dos tecidos periféricos ao fígado, suprimindo a sua acumulação nestes locais.

Desta forma, a função essencial do colesterol HDL passa pelo início de um longo processo que é o transporte reverso de colesterol, que ocorre através do plasma e para o fígado, que processa a eliminação do excesso de colesterol do organismo.¹⁶

A existência de métodos de análise para determinação dos níveis de colesterol nos alimentos são cruciais, devido à sua relação com doenças cardiovasculares, que se apresenta como a principal causa de morte prematura em todo o mundo.

Cromatografia gasosa e líquida são os métodos mais adequados para a determinação de colesterol, devido à sua capacidade de separar e quantificar este composto.

A cromatografia gasosa é a técnica analítica mais utilizado para a quantificação de colesterol e outros esteróis. No entanto, embora as colunas utilizadas na cromatografia gasosa sejam muito eficientes para a separação de colesterol, por vezes dão origem a uma possível sobreposição de colesterol com outros esteróis.

Esta desvantagem pode ser facilmente resolvida com o recurso HPLC, especialmente HPLC de fase inversa. Além disso, a análise por HPLC tem a principal vantagem de decorrer a baixa temperatura, evitando a oxidação do colesterol. No entanto, a maioria dos métodos de HPLC requerem longos períodos de preparação da amostra e consomem grandes quantidades de solventes orgânicos.

A preparação da amostra tem um enorme impacto para a determinação do colesterol. A saponificação é um dos passos mais importantes para obter o colesterol livre de outros componentes. Para este procedimento, o KOH é o solvente mais comum usado para separar o colesterol de ácidos gordos, evitando, desta forma, a interferência de triglicéridos.

Após a saponificação, para extrair estes compostos, a mistura é lavada com água ultrapura e os resíduos, tais como colesterol, permanecem na camada de solução extraída para análise. Para a extração de colesterol em alimentos complexas, tais como gema de ovo, o reagente mais comum usado é hexano, devido à sua baixa polaridade em relação ao tolueno, o que permite a formação de uma emulsão.¹⁸

Os esteróis são componentes lipídicos tetracíclicos encontrados em animais, plantas e microrganismos. Várias centenas de estruturas diferentes foram identificadas até à data. Embora o colesterol seja o principal esterol em animais, os esteróis mais comuns no reino vegetal são β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol. O colesterol é necessário para construir e manter as membranas celulares. Através da interação com as cadeias de ácidos gordos de fosfolípidos, o colesterol aumenta o acondicionamento da membrana, o que reduz a sua fluidez.

A estrutura do anel tetracíclico do colesterol contribui para a diminuição da fluidez da membrana celular, uma vez que a molécula está numa conformação trans,

tornando-se numa estrutura rígida e plana. Neste papel estrutural, colesterol reduz a permeabilidade da membrana plasmática a solutos neutros, protões, e iões de sódio. Os fitoesteróis são compostos de plantas que têm uma estrutura química e funções biológicas semelhantes às apresentadas pelo colesterol.¹⁷

1.6 Validação de métodos analíticos

Durante este estágio, não foi possível concretizar a prevista validação do método. No entanto, esse tema foi, por essa razão, abordado de uma forma teórica, mencionando os parâmetros que seriam necessários para tal.

Hoje em dia, quando todas as abordagens conduzem à busca pela qualidade total, é essencial conhecer a fundo cada fase de um processo. Neste caso, a validação é o instrumento apropriado para garantir a fiabilidade da instalação de um processo, um novo equipamento e, também, da metodologia analítica, em vários sectores em que a qualidade do produto fabricado é uma das principais razões da existência de uma empresa.¹⁹

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis à acumulação de erros, podendo, dessa forma, levar a alterações significativas do valor do resultado final.

Validar um método é tornar legítimo, através do estabelecimento de documentações, tudo que envolve o processo de produção e controlo de qualidade. Por outras palavras, validar significa garantir que o produto seja sempre fabricado da mesma forma, com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância, rigorosamente pré-estabelecidos.

Para cada caso há necessidade de resultados experimentais evidentes, que garantam a funcionalidade do método, bem como do tratamento analítico adequado, da avaliação estatística dos resultados e da definição dos critérios de aceitação.¹⁹

É fundamental que os laboratórios demonstrem, através de uma validação, que os métodos internos de ensaio que realizam diariamente conduzam a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida.²⁰

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio e compreendem o estudo de parâmetros como gama de trabalho, limites analíticos (deteção e quantificação), especificidade/seletividade, sensibilidade, precisão, exatidão.^{19,2}

1.6.1 Elaboração da curva de calibração

Para construção de uma curva de calibração, é preparado um conjunto de soluções padrão, que deverão ter concentrações distribuídas equitativamente pela gama de trabalho e são utilizadas nas mesmas condições das amostras a analisar posteriormente. Para cada uma destas soluções, é conhecida com rigor analítico a concentração do analito. Desta forma, cada padrão gera um sinal correspondente e permite o traçado da curva de calibração. Posteriormente, aquando das análises das amostras, é possível determinar a concentração do analito presente por interpolação, a partir da reta obtida. Esta reta deverá apresentar sempre um coeficiente de correlação, R, superior a 0,995.²⁰

1.6.2 Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a capacidade de um método ou equipamento para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito e depende da natureza do analito e da técnica de deteção utilizada.²⁰

Pode ser calculada através da expressão:

$$Sensibilidade = \frac{\Delta L}{\Delta C}$$

ΔL : acréscimo do valor lido

ΔC : variação da concentração

1.6.3 Gama de trabalho e linearidade

Em qualquer método quantitativo, existe uma gama de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado. Os primeiros valores dessa gama podem ser os valores dos limites de deteção e de quantificação e os últimos dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

A gama de trabalho é definida como a gama de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e são normalmente expressas nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico.

Quando se utiliza o método da curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias, que é realizado recorrendo à norma ISO 8466-1 para modelos lineares e à norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau. Segundo a norma ISO 8466-1 são recomendados dez pontos de calibração, não devendo ser em número inferior a cinco, distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações.²⁰

Quando se tem uma amostra específica, a concentração esperada deve situar-se no meio da gama de trabalho e quando a concentração do analito é desconhecida utiliza-se a gama de trabalho estudada para amostras diversificadas. Os valores medidos têm que se encontrar dentro desta gama.

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica para demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra e corresponde à zona em que a resposta varia linearmente com a concentração do analito

O coeficiente de correlação (r) é um indicador da interdependência entre o sinal medido e as concentrações dos respetivos padrões. Contudo, o coeficiente de determinação (r^2) é que deve ser utilizado para traduzir a adequabilidade de um modelo linear aos valores experimentais.^{20,21}

1.6.4 Robustez

A robustez do método é a medida da capacidade que o método apresenta em se manter inalterável face a pequenas alterações e fornecer indicações de confiança quando é executado.¹⁹ Há que salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relativamente à sua precisão.

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de YOUNDEN. Este teste baseia-se na realização de um determinado número de ensaios sobre uma amostra, realizados segundo um plano de controlo de fatores capazes de influenciar o processo. Estes ensaios devem ser realizados em duplicado, de forma a não causar interpretações erradas devido a erros acidentais.²⁰

1.6.5 Especificidade

A especificidade de um método é a sua capacidade para identificar um analito de interesse numa mistura complexa. Diz-se que um método é específico quando

permite identificar o composto de interesse relativamente a outras substâncias presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a medição obtida provém apenas do analito.

Para avaliar as interferências poder-se-á realizar um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, que deverão ser analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade, em que apenas varia a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho.²⁰

1.6.6 Limites analíticos (limite de deteção e limite de quantificação)

Para validar um método, é necessário estudar também os limites analíticos do método e, de acordo com a IUPAC, estes podem ser divididos em limite de deteção e limite de quantificação.

Os limites inferiores da curva de calibração são concentrações que indicam a capacidade de deteção e quantificação do método analítico a esse nível de concentração.²¹

O limite de deteção de um método corresponde ao valor mínimo, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável e corresponde à menor quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra.

$$LD_C = \frac{3,3S_{y/x}}{b}$$

$S_{y/x}$: Desvio padrão dos residuais da curva de calibração

b : Declive da curva de calibração

Para além do limite de deteção do método, é necessário também recorrer à determinação do limite de quantificação do método, que consiste na menor concentração a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão.

$$LQ_C = \frac{10S_{y/x}}{b}$$

$S_{y/x}$: Desvio padrão residual da curva de calibração

b : Declive da curva de calibração

No entanto, o limite de quantificação pode também ser obtido pela razão sinal/ruído, $\frac{S}{N} > 10$, em que S representa o sinal do equipamento e N o ruído da linha de base.

1.6.7 Precisão

A precisão é o grau de concordância entre os resultados de cada teste quando aplicado repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra. Normalmente, a precisão é expressa através da determinação da repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

A precisão é geralmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo. Ambas repetibilidade e reprodutibilidade são dependentes da concentração do analito e, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações.^{19,21}

A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas da mesma amostra ($n \geq 10$), efetuadas sob as mesmas condições de medição.²¹ Desta forma, espera-se que as análises sejam realizadas no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, com mesmo equipamento e mesmo tipo de reagentes, em curtos intervalos de tempo. A repetibilidade é dada pelo desvio padrão associado à média dos resultados assim obtidos e o limite de repetibilidade é o valor máximo permitido para a diferença entre dois ensaios obtidos em condições de repetibilidade, calculada para o nível de confiança a 95 %, através da fórmula:

$$r = t \sqrt{2S_{ri}} \leftrightarrow r = 1,96 \sqrt{2S_{ri}} \leftrightarrow r = 2,8 \sqrt{S_{ri}^2}$$

S_{ri} : desvio padrão de repetibilidade associado aos resultados

A reprodutibilidade, por sua vez, refere-se à precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição.²⁰

Este parâmetro avalia a imprecisão ao nível mundial e avalia as diferenças aleatórias esperadas aquando da comparação dos mesmos resultados entre laboratórios distintos. A partir do desvio padrão obtido sob condições de reprodutibilidade é possível calcular o limite de reprodutibilidade, que permite verificar se a diferença entre os valores das amostras analisadas é significativo.²¹

Precisão intermédia consiste na avaliação de resultados obtidos no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Segundo a norma ISO 5725:3, a precisão intermédia pode ser avaliada de três formas distintas: através de cartas de controlo de amplitudes aplicadas a duplicados e a padrões, quando se realizam vários ensaios sobre amostras ou padrões ou quando se realizam várias medições sobre uma mesma amostra. De acordo com esta norma o método considera-se preciso em termos de precisão intermédia se o coeficiente de variação, CV, calculado através da expressão $CV(\%) = \frac{S}{x} \times 100$, for inferior a 2,0%.²¹

S : Desvio padrão das medições

x : média das medições

1.6.8 Exatidão

A exatidão de um método analítico corresponde à proximidade do valor obtido em relação a um valor verdadeiro.

Geralmente, para se avaliar a exatidão de um método, recorre-se à utilização de materiais de referência, participação em comparações inter-laboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

Os materiais de referência certificados são utilizados no processo de validação de um método de ensaio para avaliar o desempenho do laboratório, sendo fornecidos por entidades reconhecidas e confiáveis. Na avaliação da exatidão utilizando um material de referência, os valores médios obtidos pelo laboratório e o desvio padrão de uma série de ensaios em duplicado, devem ser comparados com os valores de referência.²¹

A exatidão e a precisão são importantes atributos da validação de metodologia analítica. O primeiro deles pressupõe que não existem erros sistemáticos inerentes ao processo, enquanto o segundo reflete a dispersão dos vários resultados individuais em relação ao valor médio estando ou não próximo do valor verdadeiro.¹⁹

1.7 Sistema de controlo interno da qualidade de resultados analíticos

De forma a garantir a qualidade dos serviços oferecidos, a Silliker apresenta um sistema de controlo interno para que os resultados obtidos em laboratório se

encontrem dentro dos critérios pretendidos, eliminando constantemente a possibilidade de ocorrência de erros, através de testes diários e periódicos, tanto intra- como interlaboratoais. Esta capacidade de autodisciplina permite um maior rigor profissional, que é também avaliado através da realização de auditorias internas.

1.7.1 Daily Process Control Sample (Amostra de controlo diário do Processo)

Um DPCS, ou Daily Process Control Sample, é uma amostra interna que serve para validar os resultados das análises de todas as amostras realizadas nesse dia. Todos os dias se analisa um DPC, cujos valores são introduzidos na plataforma ZETA SAFE, uma plataforma interna que permite a elaboração de uma carta de controlo automática. Se os valores do DPC se encontrarem inseridos nos limites estabelecidos, à partida, todas as amostras realizadas nesse dia estão validadas.

1.7.2 Cartas de Controlo

O recurso a cartas de controlo é um dos meios mais eficientes para se conseguir obter controlo contínuo sobre os resultados produzidos e detetar eventuais erros através de uma representação gráfica. Existem três diferentes tipos de cartas de controlo: cartas de Shewhart, em que se representa a variação de um parâmetro selecionado em função do tempo; as cartas de controlo de amplitudes, em que se monitoriza a amplitude dos valores obtidos para ensaios repetidos; e as cartas de controlo de somas cumulativas, em que se representa o somatório dos desvios observados relativamente ao valor esperado.²² Na Silliker, são utilizadas as cartas de controlo de amplitude, que são obtidas através da plataforma interna automática, ZETA SAFE.

1.7.3 Amostras cegas

As amostras-cegas são amostras de referência certificadas, cujos valores são conhecidos e o seu emprego tem como fim o estudo da precisão dos resultados produzidos, podendo ser um meio de conhecer e avaliar o desempenho dos analistas. A sua utilização deverá ser periódica e conjugada com o recurso à análise de amostras em duplicado.²³ Na Silliker, este parâmetro é avaliado através da participação em circuitos de comparação interlaboratorial.

1.7.4 Amostras em duplicado

A análise de amostras em duplicado é uma ferramenta de enorme utilizada para a deteção de erros acidentais e de controlo da repetibilidade, mas não para o controlo de erros sistemáticos, uma vez que, caso ocorra um erro sistemático, ambas as amostras serão afetadas da mesma forma. Normalmente, é recomendado que entre 5% a 10% das análises realizadas sejam submetidas a este teste. Este teste é essencialmente recomendado para análises com vários passos e várias fontes de erro.²³

Execução experimental

Capítulo 2

2 Execução experimental

2.1 Determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos por GC-FID

2.1.1 Materiais e reagentes

Para a determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos, por GC-FID, utilizaram-se os reagentes indicados na tabela 1, com as respetivas marcas.

Tabela 1 - Reagentes utilizados na determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos por GC-FID

Reagentes	Marca
Ácido clorídrico a 35 %	VWR prolab chemical
Pirgalol (1,2,3-benzenotriol)	Sigma-Aldrich
Amoníaco a 25%	Sigma-Aldrich
Trifluoreto de boro a 20% em metanol	Sigma-Aldrich
Sulfato de sódio anidro	Sigma-Aldrich
Mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos (Supelco C38 FAME MIX (47885-U)	Sigma-Aldrich
Tritidecanoato de glicerilo com um grau de pureza de 99% (Triglicérido C13:0)	Sigma-Aldrich

Na tabela 2, estão indicados os solventes utilizados para este método, bem como as respetivas marcas.

Tabela 2 - Solventes utilizados na determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos por GC-FID

Solventes	Marca
Éter dietílico	Sigma-Aldrich
Éter de petróleo	Sigma-Aldrich
Clorofórmio	Carlo Erba
Tolueno	Carlo Erba
Etanol 95%	VWR-Prolab chemical
Metanol	VWR-Prolab chemical
Hexano	VWR-Prolab chemical

Na tabela 3, encontra-se indicada toda a instrumentação utilizada no processo.

Tabela 3 - Instrumentação utilizada na determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos por GC-FID

Instrumentação	Marca/Modelo
Balança analítica	Sartoris BP221S
Banho termostatzado com agitação	Julabo SW22
Evaporador rotativo com banho de água	Buchi
Vórtex	Velp scientific ZX3 advanced cortex

Por fim, a tabela 4 explicita as condições cromatográficas do cromatógrafo.

Tabela 4 - Condições cromatográficas utilizadas na determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos por GC-FID

Condições cromatográficas	
Coluna capilar	SUPELCO SO-2560 (100m x 0,25mm ID, 0,2 µm)
Detetor	FID a 285 °C
Injetor	Split 45:1 a 225 °C
Modo de trabalho	Pressão constante (1,6281 bar)
Volume de injeção	0,6 µL
Programa de temperatura do forno	100 °C (0 min); rampa 2 °C/min até 204 °C (15 min); 3 °C/min até 214 °C (10 min); 3 °C/min até 240 °C (16 min)
Gás de arraste	Hélio
Tempo de análise	105 minutos

2.1.2 Preparação das soluções

Solução de ácido clorídrico a 25%

A partir de uma solução comercial de ácido clorídrico concentrado, é preparada uma solução de ácido clorídrico a 25% por diluição, em água desionizada, de um volume apropriado.

Solução padrão de ésteres metílicos de ácidos gordos

Para controlar os tempos de retenção e permitir o cálculo dos fatores de resposta relativos, utilizou-se uma solução preparada por diluição da solução FAME mix C38, em n-hexano.

A mistura destes padrões com o padrão interno (C13:0 FAME) permite calcular a percentagem de ácidos gordos e de matéria gorda presente na matriz.

Solução de BF₃ a 7% em metanol

A solução a 7% é obtida por diluição de BF₃ a 20% em metanol.

Solução de etanol a 96%

A solução é preparada por diluição de etanol (≥ 99%) com água desionizada.

2.1.3 Preparação das amostras

De forma a preparar as amostras alimentares para análise, numa primeira fase, estas são trituradas até se obter uma mistura homogénea. Após este passo inicial, é pesada uma determinada quantidade de amostra que varia conforme a percentagem de matéria gorda presente. Na tabela 5, estão apresentados os valores da massa de amostra a pesar, de acordo com a percentagem de matéria gorda que cada uma contém.

Tabela 5 - Apresentação da massa a pesar para cada amostra, em função do teor de massa gorda

Teor de matéria gorda da amostra (%)	Massa (g)
0 – 3	5 – 6
4 – 10	1 – 2
11 – 20	0,7 – 1
21 – 40	0,4 – 0,6
>40	0,2 – 0,3

A esta massa pesada, são adicionados 100 mg de pirogalol e 2,00 mL de padrão interno (C13:0). Como referido anteriormente, a escolha do reagente para a hidrólise depende das características da amostra a analisar. Geralmente, grande parte dos alimentos sofre uma hidrólise ácida com ácido clorídrico a 25 %. No entanto, amostras como leites líquidos ou em pó são hidrolisados com amoníaco a 25 %. Os queijos, iogurtes e alimentos infantis à base de leite são sujeito a uma hidrólise com amoníaco a 25 % e etanol a 96%, seguido do ácido clorídrico a 35 %.

As amostras são agitadas num vórtex até se verificar a dispersão total da matriz. De seguida, são introduzidas num banho termostaticado a (75±5) °C, durante 30 minutos, sendo que são agitadas manualmente a cada dez minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, adiciona-se etanol a 96 %.

Para a extração da matéria gorda presente nas amostras, procede-se à realização de duas extrações com éter dietílico e éter de petróleo. Após a separação das fases, a parte superior (fase etérea) é decantada para um balão de fundo plano e evaporada até à secura no evaporador rotativo, a cerca de 45 °C.

De seguida, a matéria gorda é dissolvida com clorofórmio e éter dietílico. De forma a assegurar que amostra está completamente seca, uma parte da mistura é colocada num tubo de 20 mL e evaporada até à secura com recurso a uma corrente de azoto.

Após a extração da matéria gorda, procede-se à metilação dos ácidos gordos, ou seja, à formação dos ésteres metílicos. À matéria gorda extraída são adicionados trifluoreto de boro a 7 % e tolueno, levando a mistura a um banho de ultrassons. As amostras são introduzidas num banho termostaticado a 100 °C, durante uma hora, e agitadas manualmente a cada dez minutos.

Após arrefecimento à temperatura ambiente, adiciona-se água desionizada, n-hexano e sulfato de sódio anidro e procede-se a agitação. A fase superior é colocada num vial de 2 mL e conservada num frigorífico até ao momento da injeção no sistema cromatográfico.

2.1.4 Procedimento experimental

A extração da matéria gorda é feita por hidrólise ácida para a grande maioria dos alimentos, por hidrólise básica no caso dos produtos lácteos, e por combinação das duas para queijos, iogurtes e alimentação infantil à base de leite. O pirogalol (1,2,3-benzenotriol) é adicionado para minimizar a degradação oxidativa dos ácidos gordos durante a análise. Uma quantidade conhecida de triglicérido C13:0 é adicionada à mistura de padrões ésteres metílicos de ácidos gordos e a cada amostra como padrão interno, a fim de quantificar os ácidos gordos. A matéria gorda é extraída com éter dietílico e metilada com uma solução de trifluoreto de boro em metanol (formação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos). Posteriormente, a mistura é injetada no sistema cromatográfico e os ácidos gordos são detetados por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama. A identificação dos ácidos gordos é feita por comparação com os resultados da análise de uma mistura padrão C38 *FAME MIX* (uma mistura de 38 ésteres metílicos de ácidos gordos) que permite identificar a ordem de eluição dos ácidos gordos presentes. Os ácidos gordos identificados e quantificados são

convertidos matematicamente em triglicéridos, correspondendo a soma destes ao valor da matéria gorda total da amostra.

2.2 Substituição da fase móvel do GC na determinação de perfis de ácidos gordos em alimentos, por GC-FID

Na figura 13, encontra-se representada a forma como foi concretizada a alteração técnica aplicada ao cromatógrafo para a substituição da fase móvel de Hélio para Hidrogénio

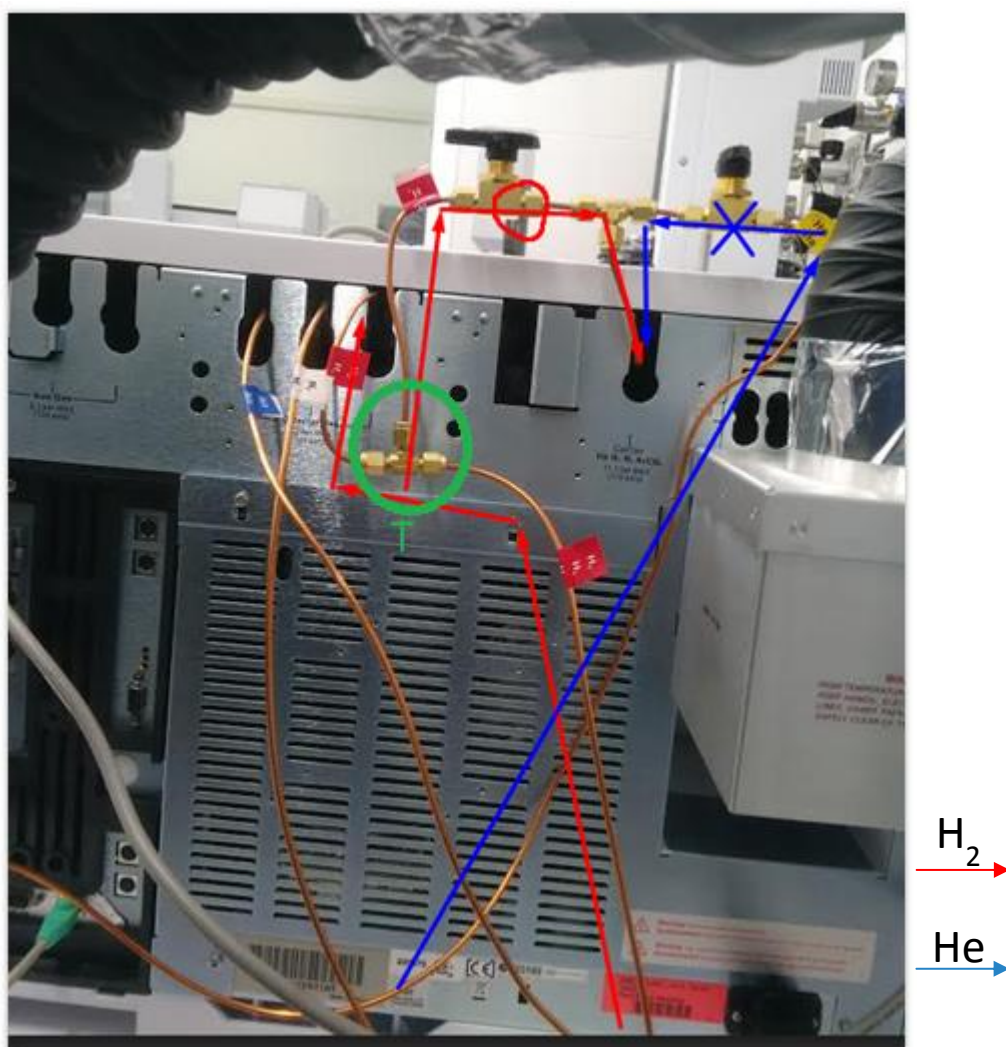


Figura 9 - Imagem representativa da alteração técnica aplicada ao cromatógrafo

A montagem da ligação em T permite que o Hidrogénio seja conduzido não só para o local de combustão, como também para a coluna cromatográfica, onde atua

como fase móvel. Por outro lado, a válvula do Hélio permanece fechada, visto que não é necessária a passagem de Hélio.

O método utilizado é exatamente o mesmo, com os mesmos passos reacionais. Por esse motivo, o que difere entre um método e o outro são as condições cromatográficas utilizadas, uma vez que estas tiveram de ser adaptadas para a utilização do hidrogénio.

Na tabela 6 estão apresentadas as condições cromatográficas utilizadas para o cromatógrafo, com a utilização de Hidrogénio como gás de arraste.

Tabela 6 - Condições cromatográficas utilizadas na determinação de perfis de ácidos gordos presentes em alimentos por GC-FID, utilizando Hidrogénio como gás de arraste.

Condições cromatográficas	
Coluna capilar	SUPELCO SP-2380 (60 m x 250 µm, 0,2 µm)
Detetor	FID a 280 °C
Injetor	Split 100:1 a 250 °C
Modo de trabalho	Pressão constante (28,00 psi)
Volume de injeção	0,6 µL
Programa de temperatura do forno	275 °C
Gás de arraste	Hidrogénio
Tempo de análise	15 min

2.3 Determinação do teor de colesterol em alimentos por GC-FID

2.3.1 Materiais e reagentes

Para a determinação do teor de colesterol presente em alimentos, por GC-FID, utilizaram-se os reagentes indicados na tabela 7, com as respetivas marcas.

Tabela 7 - Reagentes utilizados na determinação do colesterol por GC-FID

Reagentes	Marca
Hidróxido de potássio (> 85%)	VWR-Prolab chemical
Sulfato de sódio anidro	Sigma-Aldrich
α-Colestanol (> 99%)	Sigma C8003
Reagente de sililação	-
2,7-Diclorofluoresceína	Sigma-Aldrich

Na tabela 8, estão indicados os solventes utilizados para este método.

Tabela 8 - Solventes utilizados na determinação do colesterol por GC-FID

Solventes	Marca
Éter dietílico	Sigma-Aldrich
Etanol (>99%)	VWR-Prolab chemical
Hexano	VWR-Prolab chemical
Clorofórmio	VWR-Prolab chemical

Na tabela 9, está indicada a instrumentação utilizada durante todo o processo.

Tabela 9 - Instrumentação utilizada na determinação do colesterol por GC-FID

Instrumentação	Marca/Modelo
Balança analítica	Sartoris BP221S
Manta elétrica	Selecta
Placa de aquecimento	Velp Científica
Evaporador rotativo com banho de água	Buchi

A tabela 10 indica as condições cromatográficas utilizadas no cromatógrafo para este método.

Tabela 10 - Condições cromatográficas utilizadas na determinação do colesterol por GC-FID

Condições cromatográficas	
Coluna capilar	Phenomenex Zebron ZB-5 (30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm)
Detetor	FID a 330°C
Injetor	Split 20:1 a 295°C
Modo de trabalho	Pressão constante (1,6281 bar)
Volume de injeção	0,6 µL
Programa de temperatura do forno	275°C (isotérmica)
Gás de arraste	Hélio
Tempo de análise	20 min

2.3.2 Preparação das soluções

Solução etanólica de hidróxido de potássio a 0,2 N

Dissolução de 13 g de hidróxido de potássio em 20 mL de água desionizada e junção de etanol até perfazer um litro.

Solução etanólica de 2,7-Diclorofluoresceína a 0,2 (m/V)

Dissolução de 0,2 g de 2,7-Diclorofluoresceína em 100 mL de etanol e adição de algumas gotas de uma solução alcoólica 2 N de hidróxido de potássio.

Solução de padrão interno de α -colestanol

Dissolução de 20 mg de α -Colestanol em 10 mL de Clorofórmio.

2.3.3 Resumo do método

Este método para determinação do teor do colesterol em alimentos por GC-FID consiste em 4 fases distintas:

1. Saponificação da amostra, adicionado de α -colestanol como padrão interno, com hidróxido de potássio em solução etanólica.
2. Extração do insaponificável com éter etílico.
3. Separação da fração esterólica e de diálcoois triterpénicos, do extrato insaponificável, por cromatografia em camada fina realizada em placas de sílica-gel alcalinizadas.
4. Conversão da fração recuperada do sílica-gel em éteres trimetilsilílicos. Análise dos éteres por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar.

2.3.4 Procedimento experimental

2.3.4.1 Preparação do extrato insaponificável

Para a preparação do extrato insaponificável, introduz-se num balão de 250 ml, por meio de uma microsiringa de 500 μ l, um volume da solução padrão interno de α -colestanol que contenha uma quantidade de colestanol correspondente a cerca de 10 % do teor de esteróis da amostra. Por exemplo, para 5 g de amostra, adiciona-se 500 μ l de solução de α -colestanol, caso se trate de azeite, e 1500 μ l, caso se trate de óleo

de bagaço de azeitona. De seguida, evapora-se em banho-maria com uma corrente ligeira de azoto até à secura, deixa-se arrefecer o balão e, em seguida, pesa-se exatamente $5 \pm 0,01$ g de amostra seca e filtrada para o mesmo balão.

No caso das matérias gordas vegetais e animais que contêm quantidades consideráveis de colesterol, pode observar-se um pico com tempo de retenção próximo do tempo de retenção do pico do colestanol. Nesse caso, é necessário analisar a fração esterólica em duplicado, com e sem padrão interno.

Seguidamente, junta-se 50 ml de solução etanólica 2N de hidróxido de potássio, monta-se o condensador de refluxo e aquece-se em banho-maria até uma ligeira ebulição, até que se produza a saponificação (a solução fica límpida). Continua-se a aquecer durante 20 minutos, junta-se 50 ml de água destilada ao condensador, que será depois retirado e arrefece-se o balão até cerca de 30 °C.

Após o arrefecimento do balão, transfere-se o conteúdo do mesmo para uma ampola de decantação de 500 ml, utilizando diversas vezes água destilada (50 ml). Junta-se cerca de 80 ml de éter etílico e agita-se vigorosamente durante cerca de 60 segundos. Liberta-se a pressão de vez em quando, invertendo a ampola e retirando a tampa e deixa-se em repouso até à separação completa das duas fases. As eventuais emulsões que poderão ocorrer, podem ser eliminadas juntando pequenas quantidades de etanol.

Em seguida, separa-se a fase saponificada, tão completamente quanto possível, para outra ampola de decantação. Procede-se a duas outras extrações análogas da fase aquosa, utilizando de cada vez 60-70 ml de éter etílico.

Os três extratos etéreos são reunidos numa ampola de decantação que já contenha 50 ml de água. Prossegue-se então com a lavagem com água (50 ml), até a água deixar de produzir uma coloração rosada por adição de uma gota de solução de fenoltaleína.

Uma vez eliminada a água de lavagem, a solução é filtrada através de sulfato de sódio anidro para um balão de 250 ml previamente tarado. A ampola de decantação e o filtro são lavados com pequenas quantidades de éter etílico.

Seguidamente, o solvente é evaporado por destilação sob vácuo, a 30°C, num evaporador rotativo. Adiciona-se 5 ml de acetona e eliminar completamente o solvente volátil com uma ligeira corrente de ar. Seca-se o resíduo numa estufa a 103 ± 2 °C, durante 15 minutos, arrefece-se num exsiccador e pesa-se aproximadamente 0,1 mg.

2.3.4.2 Separação da fração esterólica

Para preparar as placas alcalinizadas para a separação da fração esterólica por cromatografia de camada fina, é necessário imergir as placas com sílica-gel cerca de 4 cm, durante 10 segundos, na solução etanólica 0,2 mol/L de hidróxido de potássio, deixar secar durante duas horas numa *hotte* e colocar numa estufa, a 100 °C, durante uma hora. Posteriormente, retira-se as placas da estufa e conserva-se num exsiccador com cloreto de cálcio até à utilização, que deve ser feita no prazo de 15 dias.

A utilização de placas de sílica-gel alcalinizadas para a separação da fração esterólica torna desnecessário o tratamento da fração insaponificável com alumina. Deste modo, todos os compostos de natureza ácida (ácidos gordos e outros) ficam retidos na linha de partida e a banda de esteróis fica nitidamente separada dos outros compostos até então presentes.

Introduz-se então uma mistura 50:50 (v/v) de n-hexano e éter etílico na câmara de revelação das placas, até uma altura de aproximadamente 1 cm. Fecha-se a câmara com uma tampa adequada e deixa-se em repouso durante, pelo menos, meia hora.

De seguida, prepara-se uma solução aproximadamente a 5 % do extrato insaponificável em acetato de etilo e, com a microseringa de 100 µl, deposita-se na placa cromatográfica, a aproximadamente 2 cm do bordo inferior, 0,3 ml da solução supracitada numa linha contínua, fina e uniforme. No alinhamento da linha de partida, deposita-se 2-3 µl da solução de referência, a fim de identificar a banda de esteróis após a revelação.

Coloca-se então a placa na câmara de revelação e deixa-se eluir até que a frente de solvente chegue a cerca de 1 cm da parte superior da placa. Retira-se a placa da câmara de revelação e deixa-se evaporar o solvente.

Seguidamente, nebuliza-se a placa, ligeira e uniformemente, com a solução de 2,7-diclorofluoresceína e deixa-se a secar. Quando a placa é observada à luz ultravioleta, a banda de esteróis pode ser identificada pelo alinhamento com a mancha obtida para a solução de referência. A banda é delimitada com um lápis ao longo da margem de fluorescência.

Raspa-se então, com uma espátula, o sílica-gel da zona delimitada. Introduce-se a matéria retirada, finamente triturada, num cadinho filtrante junta-se 10 ml de acetato de etilo, mistura-se cuidadosamente com a espátula e filtra-se sob vácuo. Recolhe-se o filtrado no frasco de kitasato ligado ao cadinho de fundo filtrante.

Lava-se o resíduo no cadinho três vezes com éter etílico (cerca de 10 ml de cada vez) e recolher o filtrado no frasco de kitasato adaptado ao cadinho de fundo filtrante. Evapora-se o filtrado até se obter um volume de 4-5 ml. A solução residual é transferida para um tubo de centrifugação de 10 ml, previamente tarado, e evaporada até à secura, através de uma corrente de azoto. O resíduo contido no tubo é constituído pela fração esterólica.

2.3.4.3 Preparação dos éteres trimetilsilílicos

No tubo de centrifugação que contém a fração esterólica e de diálcoois triterpénicos, junta-se o reagente de sililação na proporção de 50 µl por miligrama de esteróis, evitando qualquer absorção de humidade.

Tapa-se o tubo de centrifugação e agita-se cuidadosamente até à solubilização completa dos compostos. Deixa-se repousar durante, pelo menos, 15 minutos, à temperatura ambiente e depois centrifuga-se durante alguns minutos. A solução límpida está pronta a ser analisada por cromatografia em fase gasosa.

2.3.4.4 Cálculo do teor de colesterol

Após a análise dos cromatogramas obtidos para cada amostra, é necessário calcular o teor de colesterol para cada uma delas. Este cálculo utiliza o valor da área do pico correspondente ao colesterol e é feito recorrendo à fórmula:

$$C = \frac{A_i \times MG \times m_p}{Ap_i \times m}$$

A_i – área do pico de colesterol na amostra, em %
 MG – teor de matéria gorda da amostra, em g/100g
 m – massa da toma, em g
 Ap_i – área do padrão interno, em %
 m_p – massa do padrão adicionada

2.4 Determinação do teor de colesterol em alimentos por GC-FID - Novo método

2.4.1 Materiais e reagentes

Para a determinação do teor de colesterol presente em alimentos, por GC-FID, utilizaram-se os reagentes apresentados na tabela 11, com as respectivas marcas.

Tabela 11 - Reagentes utilizados na determinação do colesterol por GC-FID pelo novo método

Reagentes	Marca
Hidróxido de potássio a 85%	VWR
Tolueno	VWR
Sulfato de sódio anidro	Sigma-Aldrich
Dimetilformamida	VWR
Trimetilclorosilano	Fluka
Hexametildisilano	Fluka
Colesterol (> 99%)	Fluka
σ -colestanol	Sigma C8003

Na tabela 12, encontram-se apresentados os solventes utilizados para este método.

Tabela 12 - Solventes utilizados na determinação do colesterol por GC-FID pelo novo método

Solventes:	Marca
Etanol a 96%	VWR-Prolab chemical
Dimetilformamida (DMF)	VWR-Prolab chemical
Heptano	Panreac
Acetona	Sigma-Aldrich
Clorofórmio	VWR-Prolab chemical

A tabela 13, apresenta a instrumentação utilizada neste método.

Tabela 13 - Instrumentação utilizada na determinação do colesterol por GC-FID pelo novo método

Instrumentação	
Balança analítica	Sartoris BP221S
Evaporador rotativo	Buchi
Placa de aquecimento	

As condições cromatográficas utilizadas para este método encontram-se indicadas na tabela 14.

Tabela 14 - Condições cromatográficas utilizadas na determinação do colesterol por GC-FID pelo novo método

Condições cromatográficas	
Coluna capilar	SUPERLCO SBL (15 m x 0,1 mm x 0,1 mm)
Detetor	FID a 300°C
Injetor	Split 100:1 a 300°C
Modo de trabalho	Pressão constante (4,067 bar)
Volume de injeção	1 µL
Programa de temperatura do forno	265°C – 430°C
Gás de arraste	H ₂
Tempo de análise	7,25 min

2.4.2 Preparação de soluções

Solução de hidróxido de potássio 50%

Dissolução de 588 g de hidróxido de carbono 85% em 800 mL de água desionizada num balão volumétrico de 1000 mL e agitação até se verificar dissolução completa. Adição de água desionizada até perfazer os 1000 mL.

Solução de hidróxido de potássio 1 mol/L

Dissolução de 66 g de hidróxido de carbono 85% em 800 mL de água desionizada num balão volumétrico de 1000 mL e agitação até se verificar dissolução completa. Adição de água desionizada até perfazer os 1000 mL.

Solução de hidróxido de potássio 0,5 mol/L

Dissolução de 33 g de hidróxido de carbono 85% em 800 mL de água desionizada num balão volumétrico de 1000 mL e agitação até se verificar dissolução completa. Adição de água desionizada até perfazer os 1000 mL.

2.4.3 Preparação dos padrões

Padrão de colesterol de concentração 1000 mg/L

Junção de 0,1 g de colesterol a 50 mL de dimetilformamida num balão volumétrico de 100mL e adição posterior de Dimetilformamida até perfazer o volume final.

Padrão de colesterol de concentração 400 mg/L

Adição de 10 mL do padrão de concentração 1000 mg/L a um balão volumétrico de 25 mL e junção de dimetilformamida até perfazer o volume final.

Padrão de colesterol de concentração 100 mg/L

Adição de 5 mL do padrão de concentração 1000 mg/L a um balão volumétrico de 50 mL e junção de dimetilformamida até perfazer o volume final.

Padrão de colesterol de concentração 25 mg/L

Adição de 2,5 mL do padrão de concentração 1000 mg/L a um balão volumétrico de 100 mL e junção de dimetilformamida até perfazer o volume final.

Padrão de colesterol de concentração 1 mg/L

Adição de 0,5 mL do padrão de concentração 100 mg/L a um balão volumétrico de 50 mL e junção de dimetilformamida até perfazer o volume final.

Padrão interno σ -colestanol

Adição de 0,01 g de σ -colestanol a um balão volumétrico de 50 mL e junção de 50 mL de heptano e agitar até se verificar a solubilização completa e posterior junção de heptano até perfazer o volume final.

2.4.4 Procedimento experimental

Este método consiste na determinação e quantificação de colesterol por GC-FID, prévia da realização de uma saponificação da fração lipídica, seguido de uma separação por extração líquido-líquido e uma derivatização da fração esterólica.

2.4.4.1 Saponificação da fração lipídica

Numa balança analítica, pesou-se a amostra, e juntou-se, com uma proveta, 40 mL de etanol 96% e, com uma pipeta graduada de 10 mL, 8 mL da solução de hidróxido de sódio 50%. De seguida, adicionou-se um agitador magnético e manteve-se a ebulição, numa placa de aquecimento com agitação, durante cerca de 60 minutos. No final dos 60 minutos, juntou-se 60 mL de etanol 96% e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente.

2.4.4.2 Extração líquido-líquido da fase esterólica

Para se separar a fase esterólica da fase não-esterólica, primeiramente, adicionou-se, com um doseador, 100 mL (2 x 50 mL) de tolueno a um matraz de fundo redondo de 250 mL, contendo a fração insaponificável, e agitou-se durante 30 segundos.

De seguida, transferiu-se o conteúdo do balão para uma ampola de decantação de 500 mL. Juntou-se, com uma proveta, 110 mL da solução de hidróxido de sódio 1N, ao balão para lavar quaisquer vestígios da solução e transferiu-se também para a ampola de decantação. Agitou-se a ampola de decantação durante 1 minuto e deixou-se separar as fases. Seguidamente, rejeitou-se a fase aquosa (inferior) e juntou-se 40 mL da solução de hidróxido de potássio 0,5N à ampola de decantação. A seguir, agitou-se de novo, durante 1 minuto, e deixou-se separar as fases.

Posteriormente, rejeitou-se a fase aquosa e lavou-se 3 vezes a fase esterólica com porções de 40 mL de água desionizada, agitando brevemente a ampola de decantação e rejeitando a fase aquosa, no fim de cada lavagem.

Após as lavagens, transferiu-se o conteúdo da ampola para um balão de 250 mL através de um filtro de pregas com cerca de 20 g de sulfato de sódio anidro e agitou-se durante 15 segundos.

De seguida, evaporou-se até à secura no evaporador rotativo, adicionou-se 3 mL de acetona e evaporou-se novamente até à secura.

Por fim, voltou-se a dissolver o precipitado obtido com 3 mL de dimetilformamida, adicionados com uma pipeta graduada.

2.4.4.3 Derivatização da fase esterólica

Em tubos de ensaio, com as respectivas amostras e padrões, adicionou-se, com uma micropipeta de 1000 μL de amostra. De seguida, adicionou-se, com a mesma micropipeta, 200 μL de hexametildisilano e, com uma micropipeta de 100 μL , adicionou-se 100 μL de trimetilclorosilano a cada tubo. Estes foram agitados no vórtex durante cerca de 30 segundos. Após a agitação, deixou-se repousar durante 15 minutos.

Após o repouso, adicionou-se a cada tubo, com uma micropipeta de 1000 μL , 1000 μL da solução de padrão interno σ -colestanol.

Resultados e discussão

Capítulo 3

3 Resultados e discussão

3.1 Substituição da fase móvel do GC na determinação de perfis de ácidos gordos em alimentos

O objetivo da substituição da fase móvel do GC na determinação de perfis de ácidos gordos em alimentos consistia essencialmente na redução do processo de análise, possibilitando uma maior análise de amostras no mesmo espaço de tempo. Desta forma, foi possível aumentar significativamente a eficácia da empresa, uma vez que se verificou que o tempo de corrida de cada amostra diminuiu 14%, de 110 minutos para 15 minutos. Isto significa que, enquanto anteriormente era possível analisar apenas 13 amostras em 24h, agora é possível analisar 96 amostras a cada 24h, 14% mais.

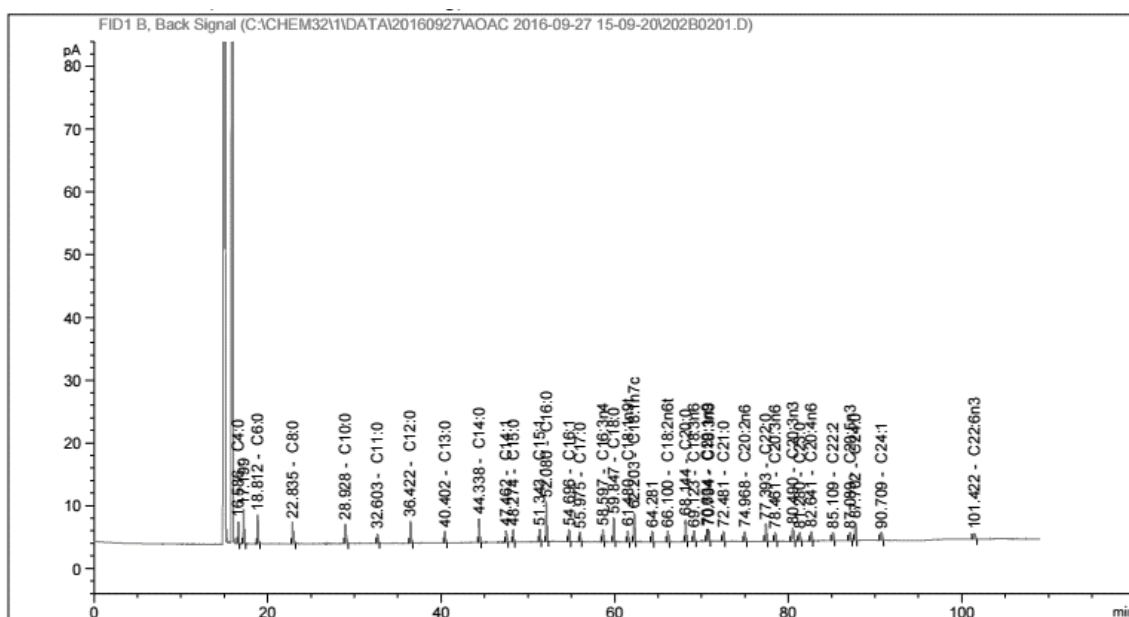
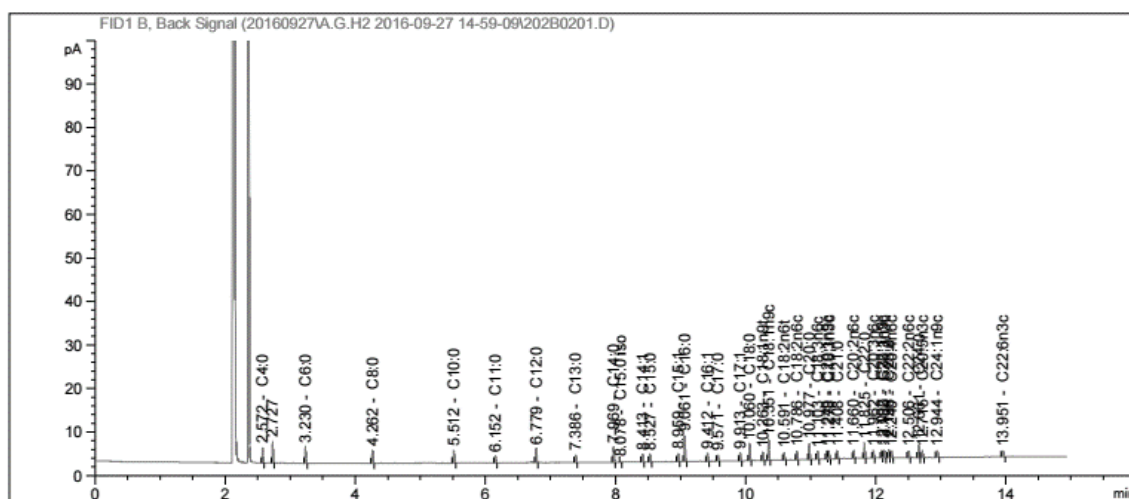


Figura 10 - Cromatograma obtido por GC-FID para uma amostra de uma conserva de peixe, utilizando Hélio como fase móvel para a determinação de perfis de ácidos gordos



O estudo foi realizado através da análise de 14 amostras em triplicado. Numa primeira fase, analisaram-se as amostras utilizando o Hélio como gás de arraste. Após a alteração técnica no cromatógrafo que permitiu a alteração do gás de arraste para o Hidrogénio, as mesmas amostras foram analisadas de novo em triplicado. O estudo foi feito através da verificação da concordância dos valores obtidos pelos dois métodos.

Para efetuar a análise estatística de avaliação da exatidão e precisão dos dois métodos, foram aplicados cinco testes estatísticos diferentes, aos quais foram atribuídos os nomes de A a E, com vista a facilitar a distinção entre eles. Os testes têm por base os testes de t de student para médias e teste F de Fisher para variâncias.²⁴

Tendo em conta que os testes realizados dependiam da existência, ou não, de uma diferença significativa entre os desvios padrão dos dois métodos realizados, foi necessário aplicar o teste de Fisher para avaliar esse parâmetro. Este teste, permite, então verificar se os desvios padrão são significativamente diferentes através da aplicação da expressão:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

onde s_1 e s_2 correspondem aos desvios padrão dos dois métodos e $s_1 \geq s_2$.

O teste A, é o teste de t de Student aplicado à comparação de médias obtidas por dois métodos e que apresentam desvios padrão, s_1 e s_2 , que não são significativamente diferentes. Neste caso, calculou-se um desvio padrão estimado comum através da fórmula:

$$s = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + ((n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Onde n_1 e n_2 são o número de medições dos respetivos métodos.

Para decidir, então, se a diferença entre as duas médias, \bar{x}_1 e \bar{x}_2 é significativa, calculou-se o t estatístico, que possui $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade através da expressão:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Após comparação com o t tabelado (t_{tab}) para um grau de confiança de 95%, caso se verifique que $|t| > t_{\text{tab}}$, conclui-se que a diferença existente entre ambas as médias é estatisticamente significativa.

O teste B é utilizado também para a comparação de dois métodos, mas que apresentam desvios padrão diferentes. O t estatístico é calculado a partir da mesma expressão utilizada para o teste A. No entanto, o número de graus de liberdade é calculado através da expressão:

$$n^{\circ} \text{ de graus de liberdade} = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}}$$

Os testes A e B são aplicados em alternativa neste estudo, pelo que todas as amostras foram validadas por apenas 4 testes.

O teste C consiste no cálculo do erro relativo para um grau de confiança de 95%. Para verificar se os valores se revelavam concordantes para este método, recorreu-se à expressão, assumindo que o método de referência é o método 2:

$$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\bar{x}_2} \times 100 < 5\%$$

Onde \bar{x}_1 corresponde à média das medições obtidas com a utilização do Hidrogénio e \bar{x}_2 à média das medições obtidas com o Hélio.

No entanto, o teste realizado na Silliker, o Teste D, difere um pouco deste uma vez que o denominador da expressão utilizada no teste C é substituído pela média entre os dois métodos, originando a expressão:

$$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\left(\frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2}{2}\right)} \times 100 < 5\%$$

Por fim, o teste E corresponde ao teste t de student aplicado à comparação de uma média experimental com um valor considerado como verdadeiro. Como o método que recorre ao Hélio como gás de arraste já se encontrava validado, resolveu-se assumir que os valores medidos por este método seriam muito exatos (considerados como os valores verdadeiros).

Neste caso, para determinar se a diferença entre a média da amostra, \bar{x} , e o valor real, μ , é significativa, calculou-se o t estatístico a partir da fórmula:

$$t = (\bar{x} - \mu) \sqrt{\frac{n}{s}}$$

n : número de medições

s : desvio padrão da amostra

Se o valor absoluto de t for superior ao valor tabelado para um determinado grau de confiança, neste caso, num nível de confiança de 95%, então a hipótese é rejeitada. Caso contrário, é aceite.

Nas secções seguintes apresentam-se os resultados obtidos pelos dois métodos analíticos para diferentes tipos de amostra.

No fim da apresentação desses resultados será apresentada uma tabela com a síntese dos cinco testes aplicados às 14 diferentes amostras.

3.2.1 Comparação de resultados obtidos com as duas fases móveis– “Vegetable oil”

Na tabela 15 e 16 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de “Vegetable oil”.

Tabela 15 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de um DPC interno, “vegetable oil”, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio							
Ácidos gordos	A	B	C	Média	Desvio padrão	RSD (%)	
Saturados (%)	9,37	9,43	9,39	9,40	0,03	0,33	
Monoinsaturados (%)	46,35	45,92	45,99	46,09	0,23	0,50	
Polinsaturados (%)	43,57	43,93	43,87	43,79	0,19	0,44	
Trans (%)	0,71	0,72	0,75	0,73	0,02	2,86	

Tabela 16 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de um DPC interno, “vegetable oil”, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio							
Ácidos gordos	A	B	C	Média	Desvio padrão	RSD (%)	
Saturados (%)	9,51	9,39	9,27	9,39	0,12	1,28	
Monoinsaturados (%)	46,54	46,5	46,52	46,52	0,02	0,04	
Polinsaturados (%)	43,15	43,36	43,42	43,31	0,14	0,33	
Trans (%)	0,79	0,79	0,77	0,78	0,01	1,47	

3.2.2 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – “Mixed fat spread”

Na tabela 17 e 18 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de “Mixed fat spread”.

Tabela 17 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de um DPC interno, “mixed fat spread”, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	22,74	-	22,79	-	22,96	-	22,83	0,12	0,51
Monoinsaturados (%)	31,07	-	31,08	-	31,08	-	31,08	0,01	0,02
Polinsaturados (%)	45,66	-	45,64	-	45,53	-	45,61	0,07	0,15
Trans (%)	0,52	-	0,48	-	0,42	-	0,47	0,05	10,63

Tabela 18 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de um DPC interno, “mixed fat spread”, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	23,04	-	23,04	-	22,73	-	22,94	0,18	0,78
Monoinsaturados (%)	31,72	-	31,72	-	31,94	-	31,79	0,13	0,40
Polinsaturados (%)	44,74	-	44,74	-	44,95	-	44,81	0,12	0,27
Trans (%)	0,48	-	0,48	-	0,37	-	0,44	0,06	14,33

3.2.3 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – “Fish oil”

Na tabela 19 e 20 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de “Fish oil”

Tabela 19 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de um DPC interno, “fish oil”, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	22,78	-	22,68	-	22,56	-	22,67	0,11	0,49
Monoinsaturados (%)	48,02	-	48,01	-	47,77	-	47,93	0,14	0,30
Polinsaturados (%)	25,6	-	25,7	-	26,07	-	25,79	0,25	0,96
Trans (%)	3,6	-	3,62	-	3,59	-	3,60	0,02	0,42

Tabela 20 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de um DPC interno, "fish oil", utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	20,93	-	20,85	-	21,14	-	20,97	0,15	0,71
Monoinsaturados (%)	46,01	-	46,12	-	46,13	-	46,09	0,07	0,14
Polinsaturados (%)	29,51	-	29,45	-	29,25	-	29,40	0,14	0,46
Trans (%)	3,55	-	3,59	-	3,46	-	3,53	0,07	1,88

3.2.4 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis - Molho de leitão

Na tabela 21 e 22 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de molho de leitão.

Tabela 21 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de molho de leitão, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	44,67	-	44,65	-	44,67	-	44,66	0,01	0,03
Monoinsaturados (%)	40,29	-	40,32	-	40,3	-	40,30	0,02	0,04
Polinsaturados (%)	14,61	-	14,61	-	14,59	-	14,60	0,01	0,08
Trans (%)	0,41	-	0,41	-	0,42	-	0,41	0,01	1,40

Tabela 22 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de molho de leitão, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	44,67	-	44,55	-	44,35	-	44,52	0,16	0,36
Monoinsaturados (%)	40,43	-	40,64	-	40,75	-	40,61	0,16	0,40
Polinsaturados (%)	14,42	-	14,36	-	14,41	-	14,40	0,03	0,22
Trans (%)	0,46	-	0,46	-	0,47	-	0,46	0,01	1,25

3.2.5 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis - Azeitona verde

Na tabela 23 e 24 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de Azeitona verde.

Tabela 23 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de azeitona verde, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	16,05	-	15,99	-	16,05	-	16,03	0,03	0,22
Monoinsaturados (%)	76,39	-	76,45	-	76,39	-	76,41	0,03	0,05
Polinsaturados (%)	7,49	-	7,5	-	7,49	-	7,49	0,01	0,08
Trans (%)	0,05	-	0,07	-	0,05	-	0,06	0,01	20,38

Tabela 24 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de azeitona verde, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	16,4	-	16,69	-	16,48	-	16,52	0,15	0,91
Monoinsaturados (%)	76,15	-	75,88	-	76,02	-	76,02	0,14	0,18
Polinsaturados (%)	7,28	-	7,24	-	7,31	-	7,28	0,04	0,48
Trans (%)	0,18	-	0,18	-	0,18	-	0,18	0,00	-

3.2.6 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis - Leite meio gordo

Na tabela 25 e 26 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis H₂ para amostras de leite meio gordo.

Tabela 25 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de leite meio gordo, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	68,88	-	68,55	-	68,56	-	68,66	0,19	0,27
Monoinsaturados (%)	25,18	-	25,5	-	25,48	-	25,39	0,18	0,71
Polinsaturados (%)	2,85	-	2,86	-	2,87	-	2,86	0,01	0,35
Trans (%)	3,07	-	3,08	-	3,08	-	3,08	0,01	0,19

Tabela 26 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de leite meio gordo, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	68,07	-	68,54	-	67,98	-	68,20	0,30	0,44
Monoinsaturados (%)	25,79	-	25,55	-	25,69	-	25,68	0,12	0,47
Polinsaturados (%)	2,94	-	2,78	-	3,16	-	2,96	0,19	6,45
Trans (%)	3,21	-	3,13	-	3,16	-	3,17	0,04	1,28

3.2.7 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – Chouriço

Na tabela 27 e 28 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de chouriço.

Tabela 27 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de chouriço, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	35,64	-	35,69	-	35,68	-	35,67	0,03	0,07
Monoinsaturados (%)	47,55	-	47,49	-	47,53	-	47,52	0,03	0,06
Polinsaturados (%)	16,31	-	16,31	-	16,27	-	16,30	0,02	0,14
Trans (%)	0,47	-	0,48	-	0,47	-	0,47	0,01	1,22

Tabela 28 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de chouriço, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	35,36	-	35,61	-	35,41	-	35,46	0,13	0,37
Monoinsaturados (%)	47,81	-	47,37	-	47,48	-	47,55	0,23	0,48
Polinsaturados (%)	16,33	-	16,45	-	16,33	-	16,37	0,07	0,42
Trans (%)	0,5	-	0,55	-	0,75	-	0,60	0,13	22,05

3.2.8 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – Bolacha

Na tabela 29 e 30 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de bolacha.

Tabela 29 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de bolacha, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	12,01	-	12,02	-	12,03	-	12,02	0,01	0,08
Monoinsaturados (%)	36,45	-	36,44	-	36,42	-	36,44	0,02	0,04
Polinsaturados (%)	51,36	-	51,36	-	51,4	-	51,37	0,02	0,04
Trans (%)	0,17	-	0,17	-	0,14	-	0,16	0,02	10,83

Tabela 30 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de bolacha, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	12,1	-	12,15	-	11,97	-	12,07	0,09	0,77
Monoinsaturados (%)	36,51	-	36,52	-	36,46	-	36,50	0,03	0,09
Polinsaturados (%)	51,15	-	51,08	-	51,24	-	51,16	0,08	0,16
Trans (%)	0,23	-	0,24	-	0,31	-	0,26	0,04	16,76

3.2.9 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – Manteiga

Na tabela 31 e 32 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de manteiga.

Tabela 31 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de manteiga, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio						
Ácidos gordos	A	B	C	Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	69,33	- 69,79	- 69,69	- 69,60	0,24	0,35
Monoinsaturados (%)	24,77	- 24,44	- 24,52	- 24,58	0,17	0,70
Polinsaturados (%)	2,39	- 2,34	- 2,35	- 2,36	0,03	1,12
Trans (%)	3,5	- 3,41	- 3,44	- 3,45	0,05	1,33

Tabela 32 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de manteiga, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio						
Ácidos gordos	A	B	C	Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	70,15	- 70,02	- 70,34	- 70,17	0,16	0,23
Monoinsaturados (%)	23,84	- 23,87	- 24,05	- 23,92	0,11	0,47
Polinsaturados (%)	2,42	- 2,47	- 2,62	- 2,50	0,10	4,16
Trans (%)	3,58	- 3,63	- 3,03	- 3,41	0,33	9,75

3.2.10 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis - Conserva de peixe

Na tabela 33 e 34 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de conserva de peixe.

Tabela 33 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de conserva de peixe, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio						
Ácidos gordos	A	B	C	Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	14,33	- 14,34	- 14,27	- 14,31	0,04	0,26
Monoinsaturados (%)	46,24	- 46,23	- 46,16	- 46,21	0,04	0,09
Polinsaturados (%)	38,8	- 38,83	- 38,86	- 38,83	0,03	0,08
Trans (%)	0,61	- 0,6	- 0,69	- 0,63	0,05	7,79

Tabela 34 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de conserva de peixe, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	15,17	-	15,44	-	15,54	-	15,38	0,19	1,24
Monoinsaturados (%)	46,79	-	46,45	-	46,52	-	46,59	0,18	0,39
Polinsaturados (%)	37,3	-	37,38	-	37,23	-	37,30	0,08	0,20
Trans (%)	0,72	-	0,71	-	0,7	-	0,71	0,01	1,41

3.2.11 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis - Queijo

Na tabela 35 e 36 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de queijo.

Tabela 35 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de queijo, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	68,04	-	68,11	-	68,04	-	68,06	0,04	0,06
Monoinsaturados (%)	26,13	-	26,08	-	26,13	-	26,11	0,03	0,11
Polinsaturados (%)	2,72	-	2,72	-	2,72	-	2,72	0,00	0,00
Trans (%)	3,08	-	3,62	-	3,08	-	3,26	0,31	9,56

Tabela 36 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de queijo, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	67,59	-	67,72	-	67,5	-	67,60	0,11	0,16
Monoinsaturados (%)	26,43	-	26,42	-	26,52	-	26,46	0,06	0,21
Polinsaturados (%)	2,91	-	2,8	-	2,86	-	2,86	0,06	1,93
Trans (%)	3,07	-	3,06	-	3,11	-	3,08	0,03	0,86

3.2.12 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis – Cereais

Na tabela 37 e 38 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de cereais.

Tabela 37 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de cereais, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio							
Ácidos gordos	A		B		C	Média	Desvio padrão RSD (%)
Saturados (%)	18,01	-	17,91	-	17,9	17,94	0,06 0,34
Monoinsaturados (%)	41,12	-	41,14	-	41,19	41,15	0,04 0,09
Polinsaturados (%)	40,86	-	40,95	-	40,91	40,91	0,05 0,11
Trans (%)	0,00	-	0,00	-	0,00	0,00	0,00 -

Tabela 38 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de cereais, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio							
Ácidos gordos	A		B		C	Média	Desvio padrão RSD (%)
Saturados (%)	17,74	-	18,03	-	18,19	17,99	0,23 1,27
Monoinsaturados (%)	41,74	-	41,64	-	41,59	41,66	0,08 0,18
Polinsaturados (%)	40,45	-	40,26	-	40,16	40,29	0,15 0,37
Trans (%)	0,06	-	0,05	-	0,05	0,05	0,01 10,83

3.2.13 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis hélio-hidrogénio - Prato cozinhado

Na tabela 39 e 40 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de prato cozinhado.

Tabela 39 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de um prato cozinhado, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio							
Ácidos gordos	A		B		C	Média	Desvio padrão RSD (%)
Saturados (%)	17,7	-	17,71	-	17,66	17,69	0,03 0,15
Monoinsaturados (%)	75,23	-	75,19	-	75,24	75,22	0,03 0,04
Polinsaturados (%)	6,97	-	7,00	-	7,01	6,99	0,02 0,30
Trans (%)	0,09	-	0,09	-	0,09	0,09	0,00 0,00

Tabela 40 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de um prato cozinhado, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	18,44	-	18,51	-	18,4	-	18,45	0,06	0,30
Monoinsaturados (%)	75,39	-	75,32	-	75,38	-	75,36	0,04	0,05
Polinsaturados (%)	6,02	-	6,04	-	6,06	-	6,04	0,02	0,33
Trans (%)	0,12	-	0,12	-	0,15	-	0,13	0,02	13,32

3.2.14 Comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis - Tosta

Na tabela 41 e 42 apresentam-se os valores obtidos para a comparação de resultados obtidos pelas duas fases móveis para amostras de tosta.

Tabela 41 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de uma tosta, utilizando o Hélio como gás de arraste

Hélio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	9,88	-	9,83	-	9,83	-	9,85	0,03	0,29
Monoinsaturados (%)	78,02	-	78,06	-	78,04	-	78,04	0,02	0,03
Polinsaturados (%)	11,95	-	11,97	-	11,96	-	11,96	0,01	0,08
Trans (%)	0,14	-	0,13	-	0,16	-	0,14	0,02	10,66

Tabela 42 - Valores obtidos, em percentagem, para os ácidos gordos presentes em 3 repetições, A, B e C, de uma amostra de uma tosta, utilizando o Hidrogénio como gás de arraste

Hidrogénio									
Ácidos gordos	A		B		C		Média	Desvio padrão	RSD (%)
Saturados (%)	9,76	-	9,96	-	9,7	-	9,81	0,14	1,39
Monoinsaturados (%)	78,03	-	77,91	-	77,87	-	77,94	0,08	0,11
Polinsaturados (%)	12	-	11,92	-	12,21	-	12,04	0,15	1,24
Trans (%)	0,2	-	0,21	-	0,2	-	0,20	0,01	2,84

3.3 Estudo estatístico para as 14 comparações realizadas

Na tabela 43, estão as conclusões obtidas no estudo estatístico realizado para as 14 comparações.

Tabela 43 - Resultados obtidos para os cinco testes aplicados a 14 amostras diferentes

Ác. gordos	Saturados					Monoinsaturados					Polinsaturados					Trans				
Testes Amostras	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
“Vegetable oil”	S	-	S	S	S	-	S	S	S	N	S	-	S	S	N	N	-	N	N	N
“Mixed fat spread”	S	-	S	S	S	-	N	S	S	N	N	-	S	S	N	S	-	N	N	S
“Fish oil”	N	-	N	N	N	N	-	S	S	N	N	-	N	N	N	-	S	S	S	S
Molho de leitão	-	S	S	S	S	-	S	S	S	S	N	-	S	S	N	N	-	N	N	N
Azeitona verde	-	S	S	S	N	N	-	S	S	N	-	N	S	S	N	-	N	N	N	N
Leite ½ gordo	S	-	S	S	S	S	-	S	S	S	-	S	S	S	S	-	S	S	S	S
Chouriço	-	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	S	N	N	S
Bolacha	-	S	S	S	S	S	-	S	S	S	N	-	S	S	N	-	N	N	N	S
Manteiga	S	-	S	S	N	N	-	S	S	N	-	S	N	N	S	-	S	S	S	S
Conserva de peixe	-	N	N	N	N	-	S	S	S	S	N	-	S	S	N	-	S	N	N	N
Queijo	N	-	S	S	N	N	-	S	S	N	-	S	N	S	S	-	S	N	N	N
Cereais	S	-	S	S	S	N	-	S	S	N	N	-	S	S	N	-	N	N	N	N
Prato cozinhado	N	-	S	S	N	N	-	S	S	N	N	-	N	N	N	S	-	N	N	S
Tosta	-	S	S	S	S	-	S	S	S	S	-	S	S	S	S	N	-	N	N	N

Legenda: S – H_0 aceite; N – H_0 rejeitada

Hipótese nula: existe diferença significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos

A análise da tabela mostra que, para os ácidos gordos saturados, os dois métodos (He e H_2) não são equivalentes (os 4 testes estatísticos deram sempre resultado negativo – N) para as amostras de “Fish oil” e “Conserva de peixe”.

Em 4 amostras pelo menos um dos testes deu resultado negativo. Podemos considerar que os testes A e B são os mais robustos e por isso das 4 amostras apenas duas, Queijo e Prato cozinhado, podem ser considerados não validados.

Já a amostra de Azeitona verde e Manteiga podem ser considerados aptos para serem determinados pelo método do H₂, pois apresentam não concordância nos testes E mas são concordantes no teste A.

As restantes amostras apresentam equivalência He-H₂ reforçada já que o novo método foi validado pelos 4 testes.

Para os ácidos gordos monoinsaturados, nenhuma amostra foi totalmente rejeitada (não apresentaram resultado negativo para os 4 testes estatísticos).

Assumindo que os testes A e B são os mais robustos, temos 7 amostras ("Fish oil", "Mixed fat spread", Azeitona verde, Manteiga, Queijo, cereais e Prato cozinhado) que podem ser consideradas inadequadas para determinação pelo novo método. No entanto 2 dos testes validam o novo método.

Para os ácidos gordos poli-insaturados, duas amostras ("Fish oil" e Prato cozinhado) são totalmente rejeitadas (não apresentaram resultado negativo para os 4 testes estatísticos).

Entretanto, 7 amostras são rejeitadas pelo teste A/B e E. Desta 7 amostras, 6 são rejeitadas pelos testes A/B e E mas aceites pelos testes C e D, que são os testes usados na empresa. Apenas um destes 7 testes é validado pelo Teste B e E mas rejeitado pelos testes C e D.

Já no caso da gordura *trans*, 5 amostras são totalmente rejeitadas e 3 são validadas pelos 4 testes ("Fish oil", Leite meio gordo e manteiga).

Cinco amostras são validadas pelo teste considerado mais robusto (A/B) mas rejeitado por dois dos restantes testes.

Considerando que o método C é o usado pela empresa, 17 parâmetros (num total de 4 analitos em 14 amostras) são validadas simultaneamente pelo método da empresa e pelo teste A/B (30,4%) e 39 são validadas pelo teste C, da empresa (69,6%).

Este resultado está aquém das expectativas, mas convém lembrar que o número de réplicas analisadas é muito reduzido (3 repetições que é o mínimo exigível).

3.4 Determinação do teor de colesterol em alimentos por GC-FID

O método até então utilizado para a determinação do teor de colesterol por GC-FID era adequado para as análises realizadas diariamente na Silliker. No entanto, para ir ao encontro da política da empresa de apresentar excelência nos serviços prestados, é necessário aperfeiçoar, de forma constante, os métodos utilizados, de forma a aumentar a eficiência e reduzir ao máximo quaisquer erros que possam ocorrer.

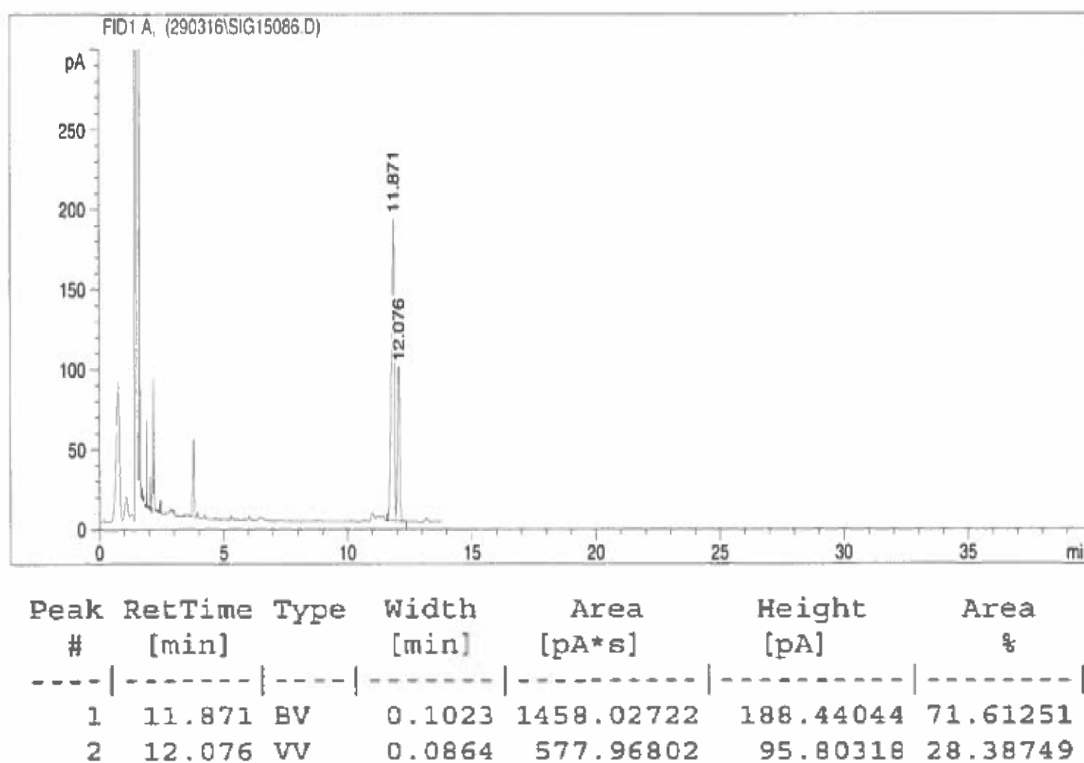


Figura 12 - Cromatograma obtido por GC-FID para a determinação do teor de colesterol presente num DPC interno

Podemos verificar através da análise do cromatograma de um DPC obtido pelo método utilizado até agora na empresa, que existe pouca separação entre os picos do colesterol (pico 2) e do padrão interno utilizado, o α -colestanol (pico 1).

O facto de os picos estarem pouco separados apresenta um problema porque quando a amostra possui elevados teores de colesterol, o respetivo pico surge demasiado junto ao pico do padrão interno, podendo sobrepor-se ao mesmo e interferir com os cálculos dos valores do padrão.

Um dos objetivos da implementação do novo método para determinação do colesterol por GC-FID em alimentos, era a obtenção de uma maior separação entre o pico referente ao colesterol e o pico do α -colestanol. Na figura 15, encontra-se

representado um cromatograma obtido com as novas condições cromatográficas, em que os picos já aparecem separados.

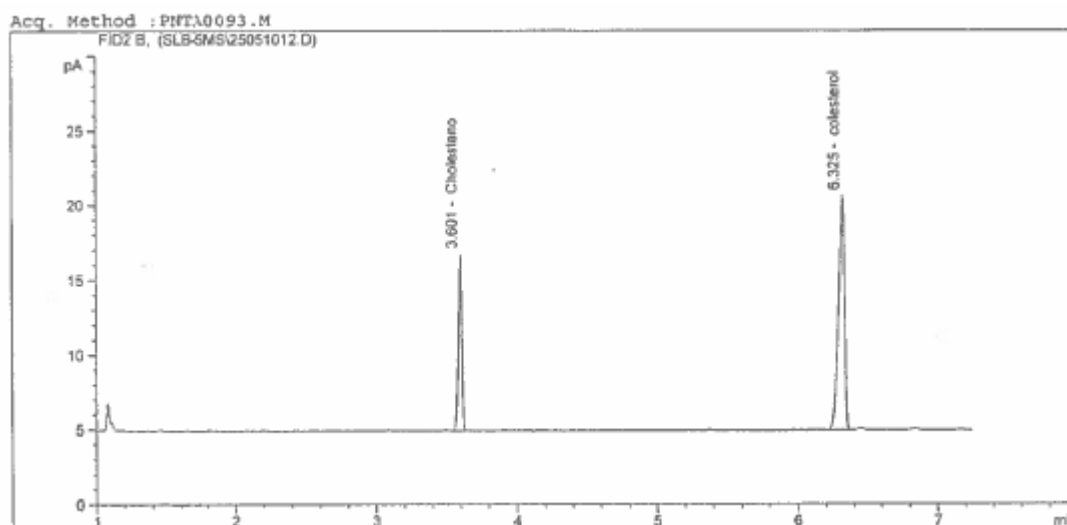


Figura 13 - Cromatograma do padrão interno obtido com as novas condições cromatográficas

O outro objetivo principal seria também eliminar as interferências químicas inevitáveis devido a contaminações do material, por exemplo. O procedimento experimental deste método envolvia vários passos reacionais, o que requeria o uso de mais material de laboratório. Desta forma, as amostras ficavam mais suscetíveis a possíveis contaminações, uma vez que, por vezes, as amostras que possuíam elevado teor de colesterol contaminavam o material que mais tarde poderia ser utilizado para analisar amostras com teor de colesterol mais baixo. A remoção das moléculas de colesterol do vidro do material é bastante difícil e não é possível de o fazer apenas lavando o material. Como o material é utilizado por vários analistas, para vários tipos de amostras, a sua contaminação era algo relativamente fácil de acontecer, apesar de haver imenso cuidado. Assim, o material tinha de ser esterilizado para voltar a ser utilizado novamente.

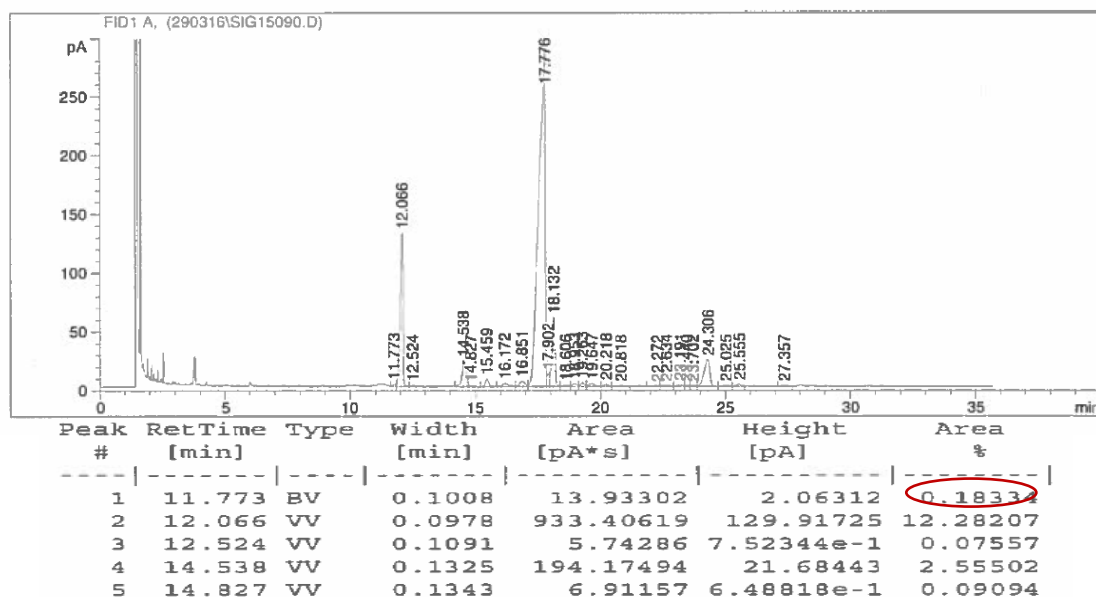


Figura 14 - Cromatograma obtido por GC-FID para a determinação do teor de colesterol presente numa amostra de azeite não contaminado

Através da análise da tabela de valores referentes ao cromatograma de uma amostra de azeite é possível prever se ocorreram, ou não, contaminações, devido ao facto de se conhecer minimamente o intervalo de valores convencionais para o azeite. No entanto, para se obter a confirmação, é necessário recorrer ao cálculo do teor de colesterol.

Caso a amostra não se encontre contaminada, o valor da área do pico será relativamente baixo. O cálculo do teor de colesterol permitirá, então confirmar se a amostra se encontra, ou não, de acordo com a legislação, sendo que a legislação apenas permite a existência de 0,5% de colesterol num produto alimentar, ou seja, neste caso, um máximo de 0,5 mg de colesterol por 100 gramas de azeite. Através da aplicação da fórmula, foi confirmado que esta amostra se encontrava dentro da legislação ($C = 0,3 \text{ mg}/100 \text{ g}$).

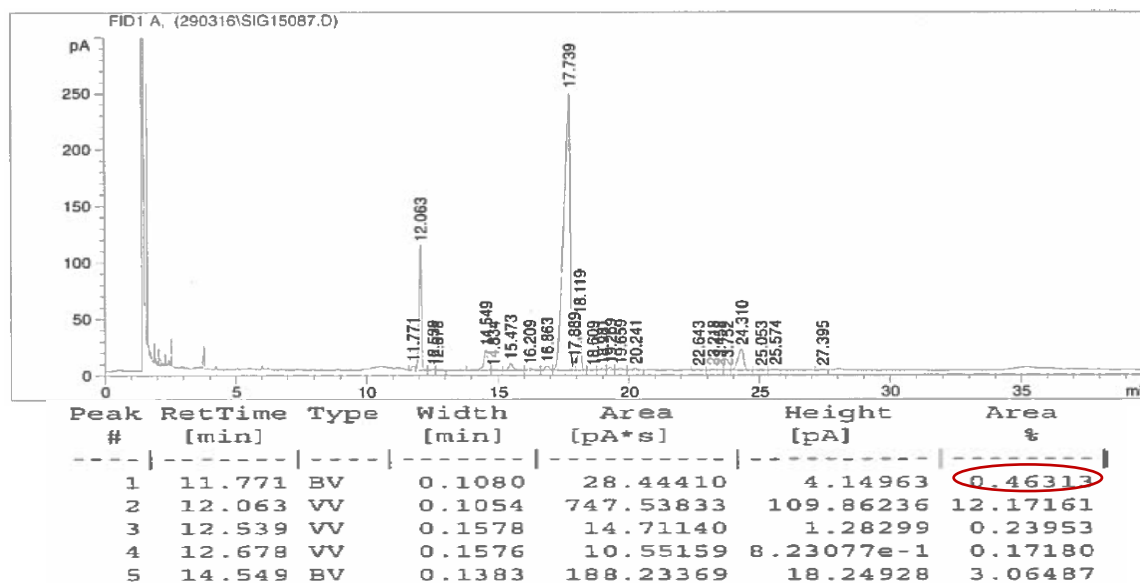


Figura 15 - Cromatograma obtido por GC-FID para a determinação do teor de colesterol presente numa amostra de azeite contaminado

Como se sabe que o azeite tem pouco colesterol, é possível perceber de imediato que houve uma contaminação da amostra ao longo do processo, devido à obtenção de um valor demasiado elevado para a área do pico do colesterol, relativamente ao convencional. Após os cálculos, confirmou-se a existência de uma contaminação, uma vez que o valor de colesterol obtido para a amostra foi de $C = 0,7$ mg/100 g, o que é impensável para uma amostra de azeite.

No entanto, quando são amostras com um teor elevado de colesterol, não existe forma de saber se ocorreu uma contaminação ou se a amostra tem, realmente, elevado teor de colesterol. Para se conseguir ultrapassar esse obstáculo, foi então proposto a utilização do novo método que, como já foi referido, envolve um menor número de passos reacionais, tendo em vista a eliminação do maior número de contaminações possível.

Considerações finais

Capítulo 4

4 Considerações finais

A crescente necessidade de fornecer a informação nutricional correta de cada vez mais produtos alimentares ao consumidor exige um aumento substancial na eficácia das entidades responsáveis pelas análises necessárias a todo o tipo de alimentos. Desta forma, espera-se que estas entidades, como a Silliker, sejam capazes de responder aos pedidos dos clientes, muitas vezes com prazos bastante curtos. Por este motivo, é necessário otimizar constantemente os métodos e processos utilizados. Neste caso, o objetivo passa sempre por acelerar o processo de análise, mas nunca comprometendo o rigor e qualidade das análises realizadas na empresa.

A troca da fase móvel na cromatografia gasosa com detetor FID para a determinação de perfis de ácidos gordos foi realizada com relativo sucesso, uma vez que se conseguiu reduzir substancialmente o tempo de corrida de 110 minutos para 15 minutos, tendo tornado possível um aumento muito significativo de 13 para 96 amostras analisadas a cada 24h. No entanto os resultados da validação ficaram aquém das expectativas. Verificou-se que 17 parâmetros (num total de 4 analitos em 14 amostras) são validadas simultaneamente pelo método da empresa e pelo teste A/B (30,4%) e 39 são validadas pelo teste C, da empresa (69,6%), mas nem sempre validado pelos restantes métodos. Pode ter contribuído para este resultado global, o facto de o número de réplicas analisadas ter sido o mínimo necessário para a estatística.

No caso da determinação do teor de colesterol em alimentos, também por GC-FID, o objetivo inicial passava por validar um novo método, com vista a reduzir os passos reacionais, e consequentemente, conseguir uma redução das contaminações ocorridas em laboratório. Apesar de se ter conseguido ainda aplicar o método, por falta de tempo, não se conseguiu atingir o real objetivo, que era a sua validação.

No entanto, foi ainda possível retirar conclusões da sua aplicação, em termo práticos. O pouco tempo de aplicação do método, ainda em fase de teste, permitiu verificar que era, de facto, possível, reduzir significativamente as interferências químicas geradoras de contaminações dos alimentos, aquando do processo laboratorial. Para além disso, conseguiu-se, também, confirmar outra mais-valia deste método. Ao passo que no método antigo, o pico do padrão interno, σ -colestanol, aparecia, inconvenientemente, demasiado próximo do pico do colesterol, devido às propriedades da nova coluna e à diferente interação com os dois compostos, ambos os picos aparecem suficientemente separados para que não haja interferências entre eles para a determinação das respetivas áreas e, consequentemente, dos respetivos valores de concentração. Por fim, mas não de todo, menos importante, o novo método também

recorre ao Hidrogénio como fase móvel do cromatógrafo, em detrimento do Hélio. Esta alteração provoca o mesmo efeito de redução do tempo de corrida das análises de 20 minutos para 7,25 minutos.

Apesar de não ter sido possível concretizar a validação deste novo método para determinação do teor de colesterol nos alimentos, prevê-se que, brevemente, se proceda à sua validação completa e que este passe a ser adotado como o método de uso corrente, uma vez que as vantagens são enormes, face ao anterior. Estas adaptações vão, assim, ao encontro da política da empresa no que toca à inovação e otimização constante dos seus métodos, para poder continuar a manter-se no topo das entidades acreditadas de controlo alimentar.

5 Bibliografia

1. merieuxnutrisciences. Available at:
<http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/grupo/historia>.
2. merieuxnutrisciences. Available at:
<http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/servicos/seguranca-e-qualidade-alimentar>.
3. merieuxnutrisciences. Available at:
<http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/silliker/sobre-a-silliker/silliker-Portugal>.
4. Reis R., Aplicação de técnicas cromatográficas à informação nutricional, Dissertação para obtenção de grau de mestre, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2016.
5. Theory and Instrumentation of GC Introduction i.
6. Sobrado LA, Freije-carrelo L, Moldovan M, Encinar JR, Alonso JIG. Comparison of gas chromatography-combustion-mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detector for the determination of fatty acid methyl esters in biodiesel without specific standards. *J Chromatogr A*. 2016;1457:134-143. doi:10.1016/j.chroma.2016.06.033.
7. Engewald W, Dettmer-wilde K. *Theory of Gas Chromatography*; 2014. doi:10.1007/978-3-642-54640-2.
8. Zhang H, Wang Z, Liu O. Development and validation of a GC – FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids \$. *J Pharm Anal*. 2015;5(4):223-230. doi:10.1016/j.jpha.2015.01.005.
9. Fan H, Smuts J, Bai L, Walsh P, Armstrong DW, Schug K a. Gas chromatography-vacuum ultraviolet spectroscopy for analysis of fatty acid methyl esters. *Food Chem*. 2016;194:265-71. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.004.
10. Yurchenko S, Sats A, Poikalainen V, Karus A. Method for determination of fatty acids in bovine colostrum using GC-FID. *Food Chem*. 2016;212:117-122. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.103.
11. Huang Z, Wang B, Crenshaw A a. A simple method for the analysis of trans fatty acid with GC–MS and AT™-Silar-90 capillary column. *Food Chem*. 2006;98(4):593-598. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.013.
12. Petrović M, Kezić N, Bolanča V. Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples. *Food Chem*. 2010;122(1):285-291. doi:10.1016/j.foodchem.2010.02.018.
13. Voortman T, Hooven EH Van Den, Braun KVE, et al. Progress in Lipid Research Effects of polyunsaturated fatty acid intake and status during pregnancy , lactation , and early childhood on cardiometabolic health : A systematic review. *Prog Lipid Res*. 2015;59:67-87. doi:10.1016/j.plipres.2015.05.001.
14. Poppel G Van, Leth T, Gevers E, Amelsvoort J Van. Trans Fatty Acids in Foods in Europe : The TRANSFAIR Study 1. 1998;136:112-136.
15. Cruz R, Graça P. Trans fatty acids in the Portuguese food market. 2016;64:128-134. doi:10.1016/j.foodcont.2015.12.010.
16. Cvetkovic Z. Cholesterol : Absorption , Function and Metabolism. 2016:47-52. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00151-3.

17. Chen Y-Z, Kao S-Y, Jian H-C, et al. Determination of cholesterol and four phytosterols in foods without derivatization by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Food Drug Anal.* 2015;23(4):636-644. doi:10.1016/j.jfda.2015.01.010.
18. Albuquerque TG, Oliveira MBPP, Sanches-Silva A, Costa HS. Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 2016;193:18-25. doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.109.
19. Valentini SR, Sommer WA, Matioli G. Validação de métodos analíticos. 2007;11(2):26-31.
20. Guia Relacre 13, Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE), Edição de Fevereiro 2000.
21. Figueiredo MP. Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar, Dissertação para obtenção do grau de mestre, Universidade de Coimbra
22. Guia Relacre 9, Alguns Exemplos de Cartas de Controlo em Laboratórios de Análise Química, Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE), Edição de Novembro 1998
23. Guia Relacre 3, Validação de Resultados em Laboratórios Químicos, Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE), Edição de Janeiro 1996.
24. Miller JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 4th Edition.*